






NUCLEIC ACID FRACTIONATION BY COUNTER-MIGRATION CAPILLARY ELECTROPHORESIS**Publication number:** DE69026090T**Publication date:** 1996-11-14**Inventor:** CHIN ALLAN (US)**Applicant:** PERKIN ELMER CORP (US)**Classification:****- international:** **C12Q1/68; G01N27/447; C12Q1/68; G01N27/447;**
(IPC1-7): B01D57/02; G01N27/447**- European:** C12Q1/68; C12Q1/68B6; C12Q1/68B6A;
G01N27/447B5; G01N27/447C2**Application number:** DE19906026090T 19900806**Priority number(s):** US19890390631 19890807; WO1990US04380
19900806**Also published as:** WO9102244 (A1)
 EP0486559 (A1)
 US5110424 (A1)
 US5096554 (A1)
 EP0486559 (A4)

more >>

Report a data error he

Abstract not available for DE69026090T

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁵ :

G01N 27/26, B01D 57/02

A1

(11) International Publication Number:

WO 91/0224

(43) International Publication Date:

21 February 1991 (21.02.91)

(21) International Application Number: PCT/US90/04380

(22) International Filing Date: 6 August 1990 (06.08.90)

(30) Priority data:

390,631

7 August 1989 (07.08.89)

US

(71) Applicant: APPLIED BIOSYSTEMS, INC. [US/US]; 850
Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 (US).(72) Inventor: CHIN, Allan, Michael ; 854 Seale Avenue, Palo
Alto, CA 94303 (US).(74) Agent: SMITH, Joseph, H.; Applied Biosystems, Inc., 850
Lincoln Centre Drive, Foster City, CA 94404 (US).(81) Designated States: AT (European patent), BE (European patent), CH (European patent), DE (European patent)⁴, DK (European patent), ES (European patent), FR (European patent), GB (European patent), IT (European patent), JP, LU (European patent), NL (European patent), SE (European patent).

Published

With international search report.

(54) Title: NUCLEIC ACID FRACTIONATION BY COUNTER-MIGRATION CAPILLARY ELECTROPHORESIS

(57) Abstract

A method of fractionating nucleic acid fragments is disclosed. The method is based on counter migration of the fragments in an upstream direction through a polymer solution which is moving by electroosmotic flow in a downstream direction. Fractionation of selected-size nucleic acid fragments can be enhanced by reducing the difference between the electroosmotic flow rate and the migration rates of the selected-size fragments.



①⑨ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

⑫ **Übersetzung der
europäischen Patentschrift**

⑧⑦ **EP 0 486 559 B1**

⑩ **DE 690 26 090 T 2**

⑤① Int. Cl.⁶:
B 01 D 57/02
G 01 N 27/447

②①	Deutsches Aktenzeichen:	690 26 090.3
⑧⑥	PCT-Aktenzeichen:	PCT/US90/04380
⑧⑥	Europäisches Aktenzeichen:	90 912 127.9
⑧⑦	PCT-Veröffentlichungs-Nr.:	WO 91/02244
⑧⑥	PCT-Anmeldetag:	6. 8. 90
⑧⑦	Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung:	21. 2. 91
⑧⑦	Erstveröffentlichung durch das EPA:	27. 5. 92
⑧⑦	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	20. 3. 96
④⑦	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	14. 11. 96

③⑩ Unionspriorität: ③② ③③ ③①
07.08.89 US 390631

⑦③ Patentinhaber:
Perkin-Elmer Corp., Foster City, Calif., US

⑦④ Vertreter:
Diehl, Glaeser, Hiltl & Partner, 22767 Hamburg

⑧④ Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

⑦② Erfinder:
CHIN, Allan, Michael, Palo Alto, CA 94303, US

⑤④ **FRAKTIONIERUNG NUKLEIDER SÄUREN MIT HILFE VON KAPILLARER ELEKTROPHORESE IN
GEGENMIGRATION**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

DE 690 26 090 T 2

DE 690 26 090 T 2

FRAKTIONIERUNG NUKLEIDER SÄUREN MIT HILFE VON
KAPILLARER ELEKTROPHORESE IN GEGENMIGRATION

1. Bereich der Erfindung

5

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf elektrophoretische Separation von Fragmenten nukleider Säuren durch kapillare Elektrophorese.

10 2. Literatur

Cantor, C., et al., "Biophysical Chemistry Parts I, II and III," W.H. Freeman and Co., N.Y. (1980).

Cohen, A.S., et al., Anal Chemistry, 59:1021 (1987).

15 Cohen, A.S., et al., J Chromatography, 458:323 (1988).

Compton, S.W., et al., BioTechniques, 6(5)432 (1988).

Kaspar, T.J., et al., J Chromatography, 458:303 (1988).

Lauer, H.H., et al., Anal Chem, 58(1):166 (1986).

20 Maniatis, T., et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Labs (1982).

Maxam, A.M., et al., Meth Enzymol, 65:499 (1980).

Sanger, F., et al., Proc Nat Acad Sci, USA, 74:5363 (1977).

Smith, L.M., et al., Nature, 321:674 (1986).

25

3. Hintergrund der Erfindung

Verfahren zur größenabhängigen Fraktionierung von Mischungen aus einsträngigen oder doppelsträngigen nukleiden Säuren sind für viele Analyse- und Zubereitungstechniken in der Biochemie entscheidend. Ein wichtiges Beispiel ist die Restriktionsanalyse, bei der eine doppelsträngige DNS mit ausgewählten Restriktionsenzymen aufgeschlossen, je nach Größe des Aufschlußfragments fraktioniert und dann nach Fragmentpositionen analysiert wird.

35

Dieses Verfahren ist beim Molekül-Cloning weit verbreitet, um die Anzahl und Anordnung von Restriktionsstellen in einem Cloning-Vektor zu bestimmen und die Einfügestelle und/ oder Ausrichtung im Vektor zu bestätigen.

5

Die Restriktionsanalyse ist auch ein wichtiges Werkzeug bei der Genabbildung, da mit ihr relativ lange Stücke von Chromosomen-DNS abgebildet und weiter sequenziert werden können, auf der Basis von Restriktionsfragmentgrößen und Überschneidung. Bei einer ähnliche Anwendung hat die Entdeckung von Verbindungen zwischen einigen genetisch bedingten Krankheiten und Polymorphismen von Restriktionsfragmentlängen beim Menschen eine Methode als Suchtest für diese genetisch bedingten Krankheiten geliefert.

15

Derzeit benutzte schnelle DNS-Sequenzierverfahren beruhen auch auf der Fähigkeit, DNS-Fragmente - üblicherweise einsträngige Fragmente - auf der Basis ihrer Größe zu fraktionieren. Beide enzymatischen Sequenzierverfahren, bei denen zufallsbestimmte Fragmente mit Dideoxynukleotiden enzymatisch erzeugt werden (Sanger), und chemische Verfahren, bei denen zufallsbestimmte Fragmente chemisch erzeugt werden (Maxam), beruhen auf der Fraktionierung und Unterscheidung der Fragmente auf der Basis der Fragmentgröße. Im einzelnen muß das Fraktionierverfahren in der Lage sein, zwischen Fragmenten zu unterscheiden, die sich nur durch ein Nukleotid unterscheiden.

30

Außerdem ist die größenabhängige Fraktionierung von Fragmenten nukleider Säuren für die Isolierung und Reinigung von DNS- oder RNS-Fragmenten sinnvoll. Beim Molekül-Cloning werden üblicherweise Restriktionsfragmente fraktioniert, um ausgewählte Fragmente für die Vektorkonstruktion zu erhalten. Bei der oligonukleotiden Synthese ist es allgemein wünschenswert, Fragmente mit der ge-

35

wünschten Oligonukleotidsequenz und Anzahl von Untereinheiten zu reinigen.

5

Bisher verwendeten Standardverfahren für die größenabhängige Fraktionierung von Fragmenten nukleider Säuren eine feste oder halbfeste Gelmatrix für die elektrophoretische Fragmentseparation. Im Fall von Fragmenten mit höherem Molekulargewicht, üblicherweise mehr als ca. 1.000 Basen, ist das bevorzugte Gelmaterial Agarose, wobei die Konzentration der Agarose zwischen ca. 0,3% für die Separierung von Fragmenten im Bereich von 5-60 Kilobasen bis zu ca. 2% für die Separierung von Fragmenten im Bereich von 100-3.000 Basenpaaren variieren kann (Maniatis). Kleinere Fragmente, üblicherweise weniger als ca. 1.000 Basenpaare, werden normalerweise in Polyacrylamidgel separiert. Die Konzentration von Acrylamidpolymer kann zwischen ca. 3,5% für die Separierung von Fragmenten im Bereich von 100-1.000 Basenpaaren und ca. 20% für die Separierung im Größenbereich von 10-100 Basenpaaren liegen.

10

15

20

25

30

Vor kurzem wurde die DNS-Fragmentseparation durch kapillare Elektrophorese (CE) vorgeschlagen (Cohen, 1987, 1988, Compton, Kaspar). Bei einem Ansatz (Kaspar) werden die Fragmente in einem geligen Polyacrylamid-Medium innerhalb des Röhrchens separiert. Für diesen Ansatz gelten viele der Beschränkungen bei der konventionellen Elektrophorese mit Acrylamid oder Agarose: die Unannehmlichkeit des Umgangs mit einem polymerisierten Gel, relativ lange Laufzeiten und die enge Größenverteilung von Fragmenten, die jede gegebene Gelkonzentration auflösen kann.

Alternativ wurde die Durchführung einer Fragmentseparation durch CE in einer Pufferlösung ohne Separationsmedium vorgeschlagen (Cohen, 1987, 1988 und Compton). Allge-

35

mein hat dieser Ansatz keine übereinstimmenden oder leicht zu interpretierenden Ergebnisse erbracht.

4. Zusammenfassung der Erfindung

5

Es ist ein allgemeines Ziel der vorliegenden Erfindung, für die größenabhängige Fraktionierung von Fragmenten nukleider Säuren ein Verfahren vorzusehen, das die oben genannten Beschränkungen im wesentlichen überwindet oder verringert, die bei elektrophoretischen Fraktionierverfahren nukleider Säuren auftreten.

10

15

Ein spezielleres Ziel der Erfindung ist es, ein solches Verfahren vorzusehen, das eine hohe Auflösung bietet, mit kurzen Fraktionierungszeiten abgeschlossen werden kann und nur Fragmentprobenmaterial im Picogramm-Bereich erfordert.

20

25

Ein weiteres Ziel der Erfindung ist es, ein solches Verfahren vorzusehen, das unter einer Vielzahl von variablen Elektrophoresebedingungen durchgeführt werden kann, von denen einige während eines elektrophoretischen Durchgangs eingestellt werden können, um die Separation zwischen oder innerhalb von Fragmenten ausgewählter Größe zu optimieren.

30

35

Es ist ein weiteres Ziel der Erfindung, ein solches Verfahren vorzusehen, bei dem die effektive Fraktionierlänge des elektrophoretischen Pfads aufgrund der Gegenmigration von Fragmenten nukleider Säuren in einer Polymerlösung in eine Richtung, während die Lösung durch elektroosmotischen Fluß durch ein Kapillarröhrchen in die Gegenrichtung gezogen wird, wesentlich länger ist als die physikalische Länge des Kapillarröhrchens, das für die Fraktionierung verwendet wird.

Bei der Ausübung des Verfahrens wird eine flüssige Probe von Fragmenten nukleider Säuren in ein Ende des mit einer flüssigen Elektrolytlösung gefüllten Kapillarröhrchens gefüllt. Die Innenfläche des Röhrchens ist beim pH-Wert der Lösung negativ geladen. Ein Ende des Röhrchens wird über die Flüssigkeit in Verbindung mit einem kathodischen Behälter gebracht, und das andere Ende des Röhrchens wird mit einem anodischen Behälter in Verbindung gebracht, der eine Polymerlösung aus ungeladenem oder nur schwach geladenem Polymer mit einem Molekulargewicht von mindestens ca. 10.000 Dalton enthält, das üblicherweise durch eine Viskosität von mindestens ca. 0,015 Pa (15 centipoise) in einer 2%igen Lösung bei Raumtemperatur gekennzeichnet ist. Bevorzugte Polymere sind hydroxylierte Polymere mit einem Molekulargewicht von ca. 50-200 Kilodalton, die durch eine Viskosität von ca. 0,2-5 Pa (200-5.000 centipoise) in einer 2%igen Lösung bei Raumtemperatur gekennzeichnet sind.

Eine Spannung, die zwischen den Behältern angelegt wird, zieht die Polymerlösung durch elektroosmotischen Fluß in und durch das Röhrchen. Die Fließgeschwindigkeit der Flüssigkeit im Röhrchen ist in Richtung des kathodischen Behälters größer als die vom Molekulargewicht abhängigen Migrationsgeschwindigkeiten der Fragmente nukleider Säuren in Richtung des anodischen Behälters. Demzufolge bewegen sich die Fragmente nukleider Säuren mit höherem Molekulargewicht schneller zum kathodischen Behälter als kleinere Fragmente, und die gesamte Migrationsdistanz aller Fragmente im Verhältnis zum Separationsmedium (der Polymerflüssigkeit) ist wesentlich größer als die Gesamtlänge des Kapillarröhrchens.

Der Grad der Fraktionierung von Fragmenten nukleider Säuren kann gemäß einem Aspekt der Erfindung verbessert werden, indem die Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses von Polymerlösung durch das Röhrchen selektiv
 5 eingestellt wird, um die Differenz zwischen der Flußgeschwindigkeit und der Migrationsgeschwindigkeit der Fragmente mit ausgewähltem Molekulargewicht zu verringern, die der Einschränkung unterliegt, daß die elektroosmotische Flußgeschwindigkeit größer sein muß als die strom-
 10 aufwärtige Migrationsgeschwindigkeit des langsamsten zu fraktionierenden Fragments. Die Wirkung der differentiellen Verringerung der elektroosmotischen Flußgeschwindigkeit oder Erhöhung der Fragmentmigration in Gegenrichtung ist eine Erhöhung der Nutzlänge, über die elektrophoretische Migration der Fragmente auftreten kann.
 15

Die elektroosmotische Flußgeschwindigkeit von Polymerlösung durch das Röhrchen kann bei einer Ausführung eingestellt werden, indem der pH-Wert der Elektrolyt- und der
 20 Polymerlösung, der die Dichte negativ geladener Gruppen an der Innenwand des Röhrchens steuern soll, verändert wird. Durch Erhöhung oder Senkung der negativen Ladungsdichte an der Wand des Röhrchens wird die elektroosmotische Flußgeschwindigkeit erhöht bzw. gesenkt. Alternativ
 25 kann die Migrationsgeschwindigkeit von Arten mit höherem Molekulargewicht gesteigert werden, indem die Konzentration von Polymer in der Lösung gesenkt wird.

Bei einer bevorzugten Ausführung des Verfahrens ist das
 30 Polymer ein wasserlösliches Hydroxylpolymer, z.B. Dextran, Polyvinylalkohol, und wasserlösliche Zelluloseverbindungen, z.B. Methylzellulose und Hydroxyethylzellulose. Das Polymer hat vorzugsweise ein Molekulargewicht von mindestens ca. 50.000 Dalton oder ist alternativ durch
 35 eine Viskosität von mindestens ca. 0,2 Pa (200 centipoi-

se) in einer 2%igen Polymerlösung bei Raumtemperatur gekennzeichnet.

5 Studien über elektrophoretische Separation von Arten nukleider Säuren in verschiedenen Polymerlösungen zeigen, daß die Migrationsgeschwindigkeit von Arten nukleider Säuren durch eine Lösung aus Hydroxylatpolymer wenigstens teilweise von der Interaktion der nukleiden Säuren mit dem Polymer abhängt. Im einzelnen kann die Auflösung von
10 Fragmenten nukleider Säuren, besonders von Arten mit geringerem Molekulargewicht, durch die Fraktionierung in Polymerlösungen mit höherer Konzentration verbessert werden. Ein Vergleich von Migrationsgeschwindigkeitskurven mit theoretischen Modellkurven zeigt an, daß auch das
15 Sieben eine Rolle bei der Bestimmung der Migrationsgeschwindigkeit spielen kann.

Die angelegte Spannung kann bei einer oder mehr ausgewählten Frequenzen pulsieren. Gemäß einem Aspekt der Erfindung wurde herausgefunden, daß das Anlegen einer mit einer bestimmten Frequenz pulsierenden Spannung zwei divergierende Arten von Migrationsgeschwindigkeiten gegenüber den Migrationsgeschwindigkeiten in einem Feld mit konstanter Spannung erzeugt. Für relativ große Fragmente
20 wird die Migrationsgeschwindigkeit gegenüber der Migrationszeit in einem Feld mit konstanter Spannung bei wachsender Fragmentgröße progressiv verringert. Dieses Verhalten stimmt mit einem Modell überein, das auf Trägheitswirkung basiert und bei dem größere Fragmente ihre
25 Geschwindigkeit im konstanten Feld im Durchschnitt langsamer wieder erreichen.

Bei relativ kleinen Fragmenten wird andererseits die Migrationsgeschwindigkeit gegenüber der Migrationszeit in
30 einem Feld mit konstanter Spannung bei abnehmender Frag-

mentgröße erhöht. Dieses Verfahren kann nicht allein mit Trägheitswirkung erklärt werden. Dieses Phänomen kann auf verschiedene Arten ausgenutzt werden, um die Separation von Fragmenten nukleider Säuren von ausgewählter Größe zu verbessern. Um beispielsweise Fragmente in einem ausgewählten Größenbereich zu isolieren, kann die Frequenz der pulsierenden Spannung anfangs so eingestellt werden, daß vorzugsweise die gewünschten Fragmente von Arten mit höherem Molekulargewicht separiert werden. Die Frequenz wird dann so eingestellt, daß die gewünschten Fragmente von Arten mit geringerem Molekulargewicht separiert werden.

Unter einem anderen Aspekt der Erfindung kann die Auflösung von Fragmenten im Gegenmigrationssystem, und besonders von kleinen doppelsträngigen Fragmenten, verbessert werden, indem die zu separierenden Fragmente an ein Zwischenmittel, z.B. Athidiumbromid oder Akridinorange, gebunden werden.

Diese und andere Ziele und Merkmale der Erfindung werden deutlicher, wenn die folgende detaillierte Beschreibung der Erfindung in Verbindung mit den begleitenden Abbildungen gelesen wird.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 ist ein schematisches Diagramm eines kapillaren Elektrophoresesystems mit Gegenmigration, das bei der Ausführung des Verfahrens verwendet wird;

Fig. 2 ist eine schematische Ansicht eines kapillaren Elektrophoresesystems zum Simultanbetrieb mit pulsierender und konstanter Spannung;

Fig. 3 ist ein vergrößerter Teilbereich eines kapillaren Elektrophoreseröhrchens und stellt den elektroosmotischen Fluß (e) von rechts nach links und die Fragmentmigration (m_1 , m_2 , m_3) von links nach rechts dar;

5

Fig. 4 ist ein Elektropherogramm von doppelsträngigen DNS-Fragmenten, die gemäß der vorliegenden Erfindung in einer Lösung mit 0,25 Gew.-% Hydropropylmethylzellulose (HPMC) fraktioniert wurden;

10

Fig. 5 ist ein Elektropherogramm von doppelsträngigen DNS-Fragmenten, die in einer Pufferlösung ohne Polymer fraktioniert wurden;

15

Fig. 6 ist ein Elektropherogramm von doppelsträngigen DNS-Fragmenten, die gemäß der vorliegenden Erfindung in einer Lösung mit 0,1 Gew.-% HPMC fraktioniert wurden;

20

Fig. 7 ist ein Elektropherogramm von doppelsträngigen DNS-Fragmenten, die gemäß der vorliegenden Erfindung in einer Polymerlösung mit 0,25 Gew.-% Hydroxyethylzellulose (HEC) fraktioniert wurden;

25

Fig. 8 ist ein Elektropherogramm von doppelsträngigen DNS-Fragmenten, die gemäß der vorliegenden Erfindung in einer 1%igen Dextranpolymerlösung fraktioniert wurden;

30

Fig. 9 ist ein Elektropherogramm von doppelsträngigen DNS-Fragmenten, die gemäß der vorliegenden Erfindung in einer 1,5%igen Polyvinylalkohollösung fraktioniert wurden;

35

Fig. 10 ist ein Elektropherogramm von doppelsträngigen DNS-Fragmenten, die gemäß der vorliegenden Erfindung in

einer Lösung mit 0,25 Gew.-% HPMC mit Äthidiumbromid fraktioniert wurden;

5 Fig. 11A-11D sind Elektropherogramme von doppelsträngigen DNS-Fragmenten aus ϕ X174/HaeIII (A und B) und ϕ X174/HaeIII und 161 Basenpaar-PCR-Fragmenten (C und D), die durch CMCE mit (A und C) und ohne (B und D) Äthidiumbromid fraktioniert wurden;

10 Fig. 12 zeigt eine pulsierende Rechteckwelle und die entsprechenden Migrationsgeschwindigkeiten von relativ großen (Strichpunktlinie) und relativ kleinen (gepunktete Linie) Fragmenten nukleider Säuren während jedes Spannungsimpulses;

15 Fig. 13 zeigt die erwartete (gepunktete Linie) und beobachtete (durchgehende Linie) Beziehung zwischen Fragmentgröße und Migrationsgeschwindigkeit in bezug auf die Migrationsgeschwindigkeit in einem Feld mit konstanter Spannung;

20 Fig. 14 ist ein Elektropherogramm von doppelsträngigen DNS-Fragmenten, die gemäß der vorliegenden Erfindung in einer Lösung mit 0,25 Gew.-% HPMC bei einer Feldimpulsfrequenz von ca. 650 Hz fraktioniert wurden;

25 Fig. 15 zeigt ein exemplarisches Elektropherogramm von Restriktionsfragmenten (durchgehende Linie), die ein Fragment mit einer Zielsequenz enthalten, das zu einer markierten Probe (gepunktete Linie) hybridisiert;

30 Fig. 16 ist ein Elektropherogramm von Oligonukleotiden einer Polydeoxyadenylsäure (polyA), die gemäß der Erfin-

dung in einer Lösung mit 1 Gew.-% HPMC fraktioniert wurden; und

5 Fig. 17A-17D stellen Modell-Elektropherogramme dar, die mit einem Sequenzierverfahren mit Dideoxykettenbestimmung erhalten wurden, das erfindungsgemäß ausgeführt wurde.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

10 A. Kapillares Elektrophoresesystem

15 Fig. 2 ist eine vereinfachte schematische Ansicht eines kapillaren Elektrophoresesystems 20, das für die Ausübung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet ist. Das System umfaßt ein Kapillarröhrchen 22 mit einer Länge, die vorzugsweise zwischen 10 und 200 cm liegt, üblicherweise weniger als ca. 100 cm, und einen Innendurchmesser hat, der vorzugsweise zwischen 25 und 100 µm (Mikron) liegt, üblicherweise bei ca. 50 µm. In der abgebildeten Ausführung 20 ist das Röhrchen horizontal gelagert und die Enden sind nach unten gebogen.

25 Die Innenfläche des Röhrchens hat chemische Gruppen, die bei einem pH-Wert, der vorzugsweise zwischen ca. 4 und 9 liegt, negativ geladen sind. Die chemischen Oberflächengruppen können eine inhärente Eigenschaft des Kapillarmaterials sein, wie dies bei Röhrchen aus geschmolzenem Siliziumdioxid der Fall ist, die Oberflächensilangruppen haben. Alternativ oder zusätzlich können die Kapillarwände 30 mit bekannten Derivatisierungsreagenzien für kovalente Anbindung negativer chemischer Gruppen, z.B. Säuregruppen, an die Innenwände des Kapillars oder mit bekannten negativ geladenen Oberflächenbeschichtungen behandelt werden. Verfahren zur Derivatisierung oder Beschichtung 35 von Glas oder ähnlichem sind bereits bekannt. Ein bevor-

zugtes Kapillarröhrchen besteht aus geschmolzenem Siliziumdioxid mit einem Innendurchmesser vom 50 μm und ist bei Polymicro Technologies (Phoenix, AZ) erhältlich.

5 Allgemeiner kann das Kapillarröhrchen ein beliebiges Röhrchen oder ein Kanal sein, die eine Säule aus Polymerlösung, vorzugsweise bei einer Säulendicke von 200 μm oder weniger, aufnehmen können. Beispielsweise kann das
10 Röhrchen die Form eines Kanals haben, der auf einem Glas-träger oder ähnlichem gebildet wird, und negativ geladene Oberflächengruppen haben.

Ein anodischer Behälter 26 im System enthält eine elektrolytische Polymerlösung 28 (vgl. Abschnitt B dieser
15 Beschreibung), die durch elektroosmotischen Fluß während der Elektrophorese durch das Röhrchen gezogen wird, wie in Abschnitt C beschrieben wird. Das anodische Ende des Röhrchens, das mit 22a bezeichnet ist, wird wie gezeigt während der Elektrophorese in die Polymerlösung getaucht.

20 Ein Probenbehälter 30 im System enthält die Fragmentmischung nukleider Säuren, die in das anodische Ende des Röhrchens gefüllt werden soll. Das Probenmaterial wird vorzugsweise in der Elektrolytlösung oder in Wasser auf-
25 gelöst. Der Probenbehälter und der anodische Behälter können sich auf einem Karussell oder ähnlichem befinden, um sie in eine Position zu bringen, in der das untere anodische Ende des Röhrchens in die Behälterflüssigkeit getaucht werden kann. Obwohl dies hier nicht abgebildet
30 ist, kann das Karussell zusätzliche Behälter aufnehmen, die Lösungen zum Reinigen und Spülen des Röhrchens zwischen elektrophoretischen Durchgängen von verschiedenen Polymerlösungen enthalten, wenn zwei oder mehr Polymerlö-
35 nierverfahren eingesetzt werden.

Des gegenüberliegende, kathodische Ende des Röhrchens, das mit 22b bezeichnet ist, wird in einem kathodischen Behälter 32 abgedichtet und in eine kathodische Elektrolytlösung 34 getaucht, die sich im Behälter befindet, wie dargestellt. Ein zweites Röhrchen 38 im Behälter ist mit einem genau gesteuerten Vakuumsystem (nicht abgebildet) verbunden, um Flüssigkeit, z.B. Wasch- und Reinigungslösung oder Elektrophorese-Polymerlösung, durch das Röhrchen zu ziehen und das Probenmaterial aus nukleiden Säuren im Behälter 30 in das Röhrchen zu ziehen.

Eine Hochspannungszufuhr 40 im System ist mit dem kathodischen und dem anodischen Behälter wie dargestellt verbunden, um ein ausgewähltes elektrisches Potential zwischen den beiden Behältern anzulegen. Die Stromversorgungsleitungen sind mit Platinelektroden 41, 42 im anodischen bzw. kathodischen Behälter verbunden. Die Stromversorgung kann so ausgelegt sein, daß sie eine konstante Spannung (Gleichstrom) zwischen den Elektroden anlegt, vorzugsweise bei einer Spannungseinstellung zwischen 5 und 50 kV. Alternativ oder zusätzlich kann die Stromzufuhr so ausgelegt sein, daß sie eine pulsierende Spannung mit ausgewählter Frequenz zwischen den Behältern anlegt. Allgemein gilt: Je kürzer das Kapillarröhrchen ist, desto höher ist die elektrische Feldstärke, die angelegt werden kann, und desto schneller erfolgt die elektrophoretische Separation. Wird die Stromquelle im Impulsmodus betrieben, gibt sie vorzugsweise einen Rechteckimpuls mit einer einstellbaren Frequenz von ca. 50 Hz bis zu 1 kHz und eine RMS-Spannung von ca. 10-30 kV ab. Höhere Impulsfrequenzen bis in den MHz-Bereich können für einige Anwendungen geeignet sein. Exemplarische Gleichstrom- und Impulsspannungsversorgungen sind in Beispiel 1 bzw. 8 beschrieben.

Zum Abschluß der Beschreibung des in Fig. 1 abgebildeten Systems ist ein Detektor 44 im System neben dem kathodischen Ende des Röhrchens angebracht, der die Migration der Fragmente nukleider Säuren, die durch eine optische Erfassungszone 46 im Röhrchen wandern, optisch überwacht. Der Detektor kann entweder für die Erfassung von UV-Absorption und/oder die Erfassung von Fluoreszenzemission ausgelegt sein. Die UV-Absorption wird üblicherweise bei 240-280 nm ausgeführt, wobei beispielsweise ein Kratos 783 UV-Extinktionsdetektor verwendet wird, der von Applied Biosystems (Foster City, CA) abgeändert wurde, indem die Durchflußküvette durch einen Kapillarhalter ersetzt wurde. Die Erfassung von Fluoreszenzemission wird vorzugsweise bei einer ausgewählten Erregerwellenlänge ausgeführt, die zwischen 240 und 500 nm eingestellt werden kann, je nach Fluoreszenzart der Fragmente nukleider Säuren, wie unten erläutert wird. Ein exemplarischer Fluoreszenzdetektor ist ein HP1046A-Detektor, der bei Hewlett Packard (Palo Alto, CA) erhältlich ist und wie oben für die Kapillarröhrchenerfassung abgeändert wurde. Der Detektor wird zur Aufzeichnung elektrophoretischer Spitzen an einen Integrator/Plotter 45 angeschlossen.

Im Betrieb wird das Kapillarröhrchen gründlich gewaschen, indem geeignete Reinigungs- und Spüllösungen durch das Röhrchen gezogen werden, indem ein Vakuum an den Behälter 32 angelegt wird, wie in Beispiel 1 genauer beschrieben ist. Das Röhrchen wird dann mit mehreren Volumina der elektrolytischen Polymerlösung durchgespült, und ein kleines Volumen, üblicherweise 1-10 nl, Probenmaterial wird in das kathodische Röhrchenende gefüllt. Eine Spannung wird zwischen dem kathodischen und dem anodischen Behälter angelegt, bis alle Fragmentspitzen die Erfassungszone durchlaufen haben.

Bei einer Ausführung des Verfahrens, das unten in Abschnitt C beschrieben ist, wird die verbesserte elektrophoretische Separation der Fragmente nukleider Säuren dadurch erreicht, daß der elektrophoretische Prozeß mit einer bei einer ausgewählten Frequenz, z.B. 300-1.000 Hz, pulsierenden Spannung angetrieben wird. Bei einem bevorzugten Verfahren wird eine pulsierende Spannung angelegt, bis das vorderste (flußabwärtigste) Band direkt oberhalb der Erfassungszone liegt, dann wird das System in Gleichstrommodus umgeschaltet, um das Rauschen am Detektor zu verringern, bis alle Bänder aufgezeichnet wurden.

Fig. 2 zeigt einen Ausschnitt eines elektrophoretischen Systems 50, das bis zum Ende des elektrophoretischen Durchgangs in einem pulsierenden Feld betrieben werden kann. Das Kapillarröhrchen 52 im System hat eine kleine Unterbrechung 54 neben und stromaufwärts der Erfassungszone, die mit 56 bezeichnet ist. Die Abschnitte des Röhrchens auf beiden Seiten der Unterbrechung sind durch eine poröse Glasmanschette 58 verbunden, die die Elektrolytmigration in das und aus dem Röhrchen ermöglicht. Der verbundene Teil des Röhrchens ist in einem Behälter 60 abgedichtet, der mit einer geeigneten Elektrolytlösung 62 gefüllt ist. Eine geerdete Elektrode 64 im Behälter ist mit der Hochspannungsseite einer pulsierenden Spannungsquelle 66 verbunden, deren negative Seite mit einem geeigneten kathodischen Behälter in Verbindung steht. Die geerdete Elektrode 64 ist mit der Hochspannungsseite einer Gleichstromquelle 68 verbunden, deren negative Seite mit einem geeigneten anodischen Behälter in Verbindung steht.

Im Betrieb wird die pulsierende Spannungsquelle auf einen gewünschten Spannungs- und Frequenzwert und die Gleichspannungsquelle auf einen gewünschten Spannungswert ein-

gestellt, nachdem Probenmaterial in das anodische Ende des Röhrchens gefüllt wurde. Nukleide Fragmente in der Probe werden in dem pulsierenden Feld innerhalb des stromaufwärtigen Teils der Unterbrechung 54 fraktioniert.

5 Danach werden die Fragmente in einem Gleichspannungsfeld durch die Erfassungszone transportiert, wo die Fragmente ohne Impulsfrequenzrauschen optisch erfaßt werden können.

10 Obwohl dies hier nicht abgebildet ist, kann das Elektrophoresesystem auch leicht an das Sammeln von Fragmenten nukleider Säuren zur Vorbereitung der Elektrophorese angepaßt werden. Die Probensammlung kann beispielsweise auch die Bereitstellung einer Reihe kathodischer Behälter umfassen, in die die Fragmente eluiert werden können.

15

B. Polymerlösung

20 Die beim Verfahren verwendete elektrolytische Polymerlösung besteht aus Elektrolyten und einem Polymer, das eine flüssige Fraktioniermatrix im Röhrchen bilden kann. Zusätzlich hat die Lösung einen pH-Wert, bei dem die geladenen Oberflächengruppen an der Innenwand des Röhrchens zumindest teilweise in ihrem de-protonierten Zustand ionisiert sind. Der pH-Wert der Lösung liegt vorzugsweise
25 zwischen 4 und 9. Der pH-Wert kann so eingestellt werden, daß ein gewünschter Grad von Ladungsdichte an der Röhrchenwand erreicht wird, wie in Abschnitt C unten besprochen wird.

30 Die Elektrolyte in der Lösung können Pufferbestandteile, üblicherweise bei einer Pufferkonzentration von 10 mM, Salze, üblicherweise bei einer Konzentration von 5-10 mM, und vorzugsweise einen Schwermetallbinder, z.B. EDTA, umfassen. Zusätzlich kann die Lösung ein Denaturierungsmittel, z.B. Harnstoff, enthalten, das die Interaktion
35

zwischen den einzelnen Fragmenten und zwischen Fragmenten und Röhrchenwandung minimiert. Eine bevorzugte Polymerlösung, die in Beispiel 1-8 beschrieben wird, hat als Pufferbestandteile 10 mM Tris-Boratpuffer, pH-Wert 8,3, 5 mM NaCl, 0,1 mM EDTA und 7 M Harnstoff. Die Lösung kann auch ein Zwischenmittel enthalten, z.B. Äthidiumbromid, zu einem Zweck, der in Abschnitt C unten beschrieben wird.

Das Polymer in der Lösung ist in flüssigem, nicht-geligem Zustand von differential verzögernden Fragmenten nukleider Säuren auf Größenbasis wirksam, wenn die Fragmente unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes durch die Matrix wandern. Die Polymere sind ungeladen, haben ein Molekulargewicht von mindestens ca. 10 Kilodalton und sind durch eine Viskosität von mindestens ca. 0,015 Pa (15 centipoise) in einer 2%igen (Gew.-%) Lösung bei Raumtemperatur gekennzeichnet. Mit ungeladenem Polymer ist ein Polymer gemeint, das bei dem pH-Wert der Polymerlösung keine resultierende positive oder negative Ladung hat und das pro Polymer-Untereinheit wesentlich weniger deutlich negative oder positive Ladung hat als 1.

Bevorzugte Polymere sind hydroxylierte Polymere, z.B. Polyvinylalkohol, Hydroxyl-Methacrylat-Polymere, und Polysaccharide, z.B. Dextran und wasserlösliche Zellulose-derivate, z.B. Hydroxypropylmethylzellulose (HPMC), Hydroxyethylzellulose (HEC) und Methylzellulose (MC). Wie hierin definiert, bedeutet "hydroxyliertes Polymer" ein Polymer, das aus hydroxylhaltigen Untereinheiten gebildet wird, z.B. Vinylalkohol, 2-Hydroxyethylenmethacrylat oder ein Monosaccharid. Bevorzugte Polymere haben ein Molekulargewicht von ca. 50-200 Kilodalton und sind durch eine Viskosität von ca. 0,2-5 Pa (200-5.000 centipoise) in einer 2%igen Lösung bei Raumtemperatur gekennzeichnet.

Wie unten abgebildet, zeigen elektrophoretische Muster, die bei verschiedenen Konzentrationen von hydroxylierten Polymeren erhalten wurden, daß die Migrationsgeschwindigkeit von Fragmenten nukleider Säuren bei steigender Polymerkonzentration progressiv verringert wird. Diese Ergebnisse zeigen an, daß die Migrationsgeschwindigkeit von nukleiden Säuren durch eine Lösung aus hydroxyliertem Polymer zumindestens teilweise durch Fragmentinteraktion mit den Hydroxylgruppen des Polymers bestimmt wird. Wie oben angegeben, zeigt ein Vergleich der Migrationsgeschwindigkeitskurve mit theoretischen Modellkurven, daß das Polymer die Migrationsgeschwindigkeiten auch durch einen Siebmechanismus beeinflussen kann.

Der prozentuale Gewichtsanteil von Polymer in der Lösung kann zwischen 0,1 und 1% oder mehr variieren, je nach Größe der zu fraktionierenden Fragmente und, wenn ein pulsierendes Feld verwendet wird, nach Frequenz des angelegten Feldes, wie in Abschnitt D unten gezeigt wird.

C. Elektroosmotischer Fluß

Gemäß einem wichtigen Aspekt der Erfindung tritt die Fraktionierung von Fragmenten nukleider Säuren im Kapillarröhrchen durch größenabhängige Migration der Fragmente entgegen dem elektroosmotischen Hauptfluß der Polymerlösung im Röhrchen auf. Dieses Phänomen, das hierin als kapillare Elektrophorese in Gegenmigration (CMCE) in einer Polymerlösungsmatrix bezeichnet wird, ist in Fig. 3 abgebildet, die einen vergrößerten, fragmentarischen Teil eines kapillaren Elektrophoreseröhrchens 70 darstellt.

Wie in der Figur zu sehen ist, werden die negativ geladenen Gruppen an der Innenwand des Röhrchens, die durch das Symbol "-" dargestellt sind, durch positiv geladene Ionen

in der Polymerlösung abgeschirmt, die im wesentlichen eine positiv geladene Hülle um die Flüssigkeitssäule im Röhrchen bilden. Die Dicke der Hülle aus relativ unbeweglichen positiven Ionen an der Wandfläche wird Scherdistanz genannt. Die äußere Hülle aus positiver Ladung und die innere Ladungsverteilung der Hauptphase wird elektrische Doppelschicht genannt und ist durch Zeta-Potential gekennzeichnet, das ein Maß für das Potential zwischen der äußeren Hülle aus positiver Ladung und dem Hauptmedium ist.

Unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes wird diese Säule aus Polymerlösung im Medium (das von einer Hülle aus positiven Ladungen umgeben ist) elektroosmotisch in Richtung des negativen oder niedrigen Potentials gezogen. Die elektroosmotische Flußgeschwindigkeit im Röhrchen wird durch den Pfeil e in der Figur angegeben (der Pfeil e kann als Vektor mit einer Größe e und einer Richtung entlang der Röhrchenachse gedacht werden). Die elektroosmotische Flußgeschwindigkeit e in einem Kapillarröhrchen kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$e = \frac{\epsilon \xi E}{\eta}$$

wobei ϵ , η , ξ und E die Dielektrizitätskonstante der Flüssigkeit, ihre Viskosität, das Zeta-Potential bzw. die elektrische Feldstärke sind. Unter üblichen Elektrophoresebedingungen, z.B. wie in Beispiel 1 beschrieben, liegt die elektroosmotische Flußgeschwindigkeit im Röhrchen zwischen ca. 0,01 und 0,5 cm/sec.

Während sich die Polymerlösung im Röhrchen durch elektroosmotischen Fluß flußabwärts (in Richtung des kathodischen Behälters) bewegt, wandern die negativ geladenen

Fragmente nukleider Säuren relativ zur Lösung in entgegengesetzte Richtung zum anodischen Behälter. Fig. 3 zeigt die Migrationsgeschwindigkeiten von drei verschiedenen großen doppelsträngigen Fragmenten nukleider Säuren F_1 , F_2 und F_3 mit absteigender Größe, z.B. 1.000, 300 bzw. 50 Basenpaare. Aufgrund molekularer Interaktion der Fragmente mit den Polymermolekülen sind die Geschwindigkeiten der Fragmentmigration in Richtung des anodischen Behälters, die in der Figur mit m_1 , m_2 und m_3 bezeichnet sind, abhängig von der Größe, wobei kleinere Fragmente schneller in die anodische Richtung wandern.

Die resultierende Migrationsgeschwindigkeit der drei Fragmente durch das Röhrchen in Richtung der Kathode ist dann die Vektorsumme aus elektroosmotischem Fluß e und der größenabhängigen Migration m , die in Fig. 3 mit μ_1 , μ_2 und μ , bezeichnet sind. Wie zu sehen ist, sind diese resultierenden Migrationsgeschwindigkeiten μ der Partikel größenabhängig, wobei die größeren Fragmente schneller in Richtung der Kathode wandern als kleinere Fragmente.

Fig. 4 zeigt ein Elektropherogramm von DNS-Restriktionsfragmenten, die 1 kB DNS-Leiterfragmente (Vielfache von 1 kB-Fragmenten) und kleinere HinfI-Fragmente enthalten.

Die hohe Spitze links im Elektropherogramm ist die Vorderkante des Wassers aus der Probe, die zuerst in das Röhrchen gefüllt wurde. Die Fragmentgrößen (Basenanzahl) sind die fetten Ziffern in der Figur. Wie zu sehen ist, haben größere Fragmente kürzere Migrationszeiten. Es ist auch zu sehen, daß das System unter den eingesetzten Polymer- und elektrischen Feldbedingungen Fragmente bis zu ca. 3 Kilobasen auflösen und größere Fragmente unterscheiden, aber nicht an der Grundlinie auflösen konnte. Details zu den CMCE-Bedingungen sind in Beispiel 1 angegeben.

Aus Fig. 3 kann auch gefolgert werden, daß die effektive Fraktionierungsdistanz - die Distanz, die ein Fragment durch die Polymermatrix zurücklegt - selektiv erhöht werden kann, um die Fraktionierung dieses Fragments zu verbessern, indem die relative Geschwindigkeit des elektroosmotischen Flusses und die flußaufwärtige Fragmentmigration während der Elektrophorese variiert werden. Im einzelnen wird die tatsächliche Migrationsgeschwindigkeit μ_1 sehr klein, während sich die elektroosmotische Flußgeschwindigkeit e und die flußaufwärtige Migrationsgeschwindigkeit m_1 eines Fragments F_1 einem gemeinsamen Wert nähern, was zu längeren Separationszeiten (und effektiven Fraktionierungslängen) führt, während derer das Fragment F_1 besser aufgelöst, d.h. weiter von den Fragmenten der nächsten Größe separiert werden kann.

Experimente, die zur Unterstützung dieser Erfindung durchgeführt wurden, zeigen, daß die Migrationsgeschwindigkeit von Fragmenten nukleider Säuren durch eine ungeladene, flüssige Polymermatrix einer Anzahl von Variablen unterliegt, die sich auf Fragmentgröße, Polymerkonzentration und -art und, wenn das elektrische Feld durch eine pulsierende Spannung erzeugt wird, auf die Impulsfrequenz des Feldes beziehen. Dieses letzte Phänomen wird in Abschnitt D beschrieben.

Die Migrationsgeschwindigkeiten von Polymeren nukleider Säuren ohne Polymer im Kapillarröhrchen ist in Fig. 5 dargestellt. Die elektrophoretischen Bedingungen ähneln denen, die bei der in Fig. 4 dargestellten elektrophoretischen Separation verwendet wurden, mit Ausnahme des Fehlens von Polymer im Kapillarmedium (Beispiel 2). Ein Vergleich der beiden Figuren zeigt erstens, daß die Fragmente mit dem geringsten Molekulargewicht am schnellsten wandern, und die größten Fragmente am langsamsten wan-

5 dern. Daher scheinen die größeren Fragmente schneller als kleinere Fragmente entgegen der elektroosmotischen Flußrichtung zu wandern, möglicherweise aufgrund ihrer höheren Gesamtladung. Zweitens, daß das System nur die Auslösung zwischen breiten Größenklassen bietet, was ebenfalls einen offensichtlich großen Unterschied in der Migrationsgeschwindigkeit je nach Größe reflektiert.

10 Die Wirkung der Polymerkonzentration der relativen Migrationsgeschwindigkeit von Fragmenten nukleider Säuren ist in Fig. 6 zu sehen, die ein Elektropherogramm von Restriktionsfragmenten nukleider Säuren ist, die in einem Polymer mit 0,1 Gew.-% HPMC fraktioniert werden. Die verwendeten Fragmente und Fraktionierungsbedingungen sind identisch mit den im Verfahren aus Fig. 4 eingesetzten, mit dem Unterschied, daß die Polymerkonzentration bei der Elektrophorese aus Fig. 6 ca. 2,5mal geringer war als bei der Elektrophorese aus Fig. 4 (Beispiel 3). Ein Vergleich der beiden Figuren zeigt, daß Fragmente mit höherem Molekulargewicht besser bei der geringeren Polymerkonzentration aufgelöst wurden, während Fragmente im Größenbereich unter 1 Kilobase besser bei der höheren Polymerkonzentration aufgelöst wurden.

25 Fig. 7 zeigt ein Elektropherogramm von doppelsträngigen Fragmenten, die von CMCE in einer Polymerlösung mit 0,25 Gew.-% Hydroxyethylzellulose (HEC) fraktioniert wurden, wie in Beispiel 4 genauer beschrieben wird. Das Polymer ergab Fraktionierungseigenschaften, die zwischen denen mit 0,1 Gew.-% und 0,25 Gew.-% HPMC lagen; speziell die Auflösung von Arten mit hohem Molekulargewicht lag zwischen denen mit 0,1 Gew.-% und 0,25 Gew.-% HPMC, das die beste Auflösung von Fragmenten ergab, die größer als ca. 1 Kilobase waren, und zwischen denen mit 0,1 Gew.-% und

0,25 Gew.-% HPMC, das die beste Auflösung von Fragmenten ergab, die kleiner als ca. 1 Kilobase waren.

5 Fig. 8 zeigt ein Elektropherogramm von doppelsträngigen Fragmenten, die von CMCE in einem Dextran mit 1 Gew.-% (MW = 150.000) fragmentiert wurden, wie in Beispiel 5 beschrieben wird. Obwohl das Polymer Fragmente im Größenbereich unter ca. 1 kB deutlich auflöst, wurden Fragmente über diesem Bereich nicht aufgelöst. Geringere Dextran-
10 Konzentrationen können für eine verbesserte Auflösung im Größenbereich über 1 Kilobase erforderlich sein.

15 Fig. 9 zeigt ein Elektropherogramm von doppelsträngigen Fragmenten, die von 1,5 Gew.-% Polyvinylalkohol (PVA, MW ca. 125.000), einem nicht mit Polysaccharid hydroxyliertem Polymer fraktioniert wurden. Einzelheiten zum CMCE-Verfahren werden in Beispiel 6 angegeben. Wie das System mit 1%igem Dextran löste 1,5%iges PVA Fragmente im Größenbereich unter 1 kB deutlich auf, zeigt aber über die-
20 sem Größenbereich nur geringe Auflösungsfähigkeiten. Geringere PVA-Konzentrationen können für verbesserte Auflösung im Größenbereich über 1 Kilobase erforderlich sein.

25 Dadurch ist zu sehen, daß die Auflösung von Fragmenten von ausgewählter Größe je nach verwendetem Polymer und Konzentration des Polymers verbessert werden kann. Das bedeutet, daß die Migrationsgeschwindigkeit von Fragmenten nukleider Säuren durch ein Polymer beim CMCE-Verfahren sowohl von der Art des hydroxylierten Polymers
30 als auch von der Polymerkonzentration abhängt.

Gemäß einem anderen Aspekt der Erfindung wurde herausgefunden, daß die Auflösung innerhalb kleinerer Fragmente selektiv verbessert werden kann, indem die Fragmente,
35 vorzugsweise in doppelsträngiger Form, mit einem Zwi-

schenmittel zusammengesetzt werden. Beispiele für Zwischenmittel sind Äthidiumbromid, Akridinorange und Thiazolorange. Diese Mittel haben eine flache, frequenzabhängige Molekularstruktur, die es den Verbindungen ermöglicht, sich zwischen nebeneinanderliegende Basen nukleider Säuren zu legen (Cantor). Das Mittel ist vorzugsweise in der Polymerlösung enthalten, die durch das Röhrchen gezogen wird, um das Zwischenmittel im Gleichgewicht zwischen freier und DNS-gebundener Form zu halten.

Figur 10 zeigt ein Elektropherogramm der obigen Duplexleiter-Fragmente, die von CMCE in 0,25 Gew.-% HPMC mit 10 μmol Äthidiumbromid gemäß dem in Beispiel 7 angegebenen Verfahren fraktioniert wurden. Wie aus einem Vergleich dieser Figur mit Fig. 4 ersichtlich wird, verbessert das Zwischenmittel die Auflösung von Fragmenten, die kleiner als ca. 500 Basenpaare sind. Diese Wirkung kann durch eine größenabhängige Veränderung im Gefüge der Fragmente hervorgerufen werden, wenn sie mit einem Zwischenmittel zusammengesetzt werden. Eine ähnliche Verbesserung der Auflösung kleiner Fragmente wurde für Akridinorange beobachtet, ein anderes nicht-ionisches Zwischenmittel.

Fig. 11A-11D zeigen Elektropherogramme von Fragmentmischungen nukleider Säuren, die von CMCE mit (11A und 11C) und ohne (11B und 11D) Äthidiumbromid fraktioniert wurden. Die Fragmentmischungen umfassen die Fragmentmischung, die durch Aufschließen mit HaeIII von ϕX174 Phage (11A und 11B), die hierin $\phi\text{X174}/\text{HaeIII}$ -Mischung genannt wird, und dieselbe Fragmentmischung plus Fragmente, die durch Verstärkung von PCR (Polymerasekettenreaktion) von M13 Phage-Sequenzfragmenten, die hierin 611 Basenpaar PCR-Fragmente (11C und 11D) genannt werden, produziert

wird. Wie aus den Figuren 11A und 11B ersichtlich ist, enthält die Mischung ϕ X174/HaeIII 271 und 281 Fragmente, die nur mit Äthidiumbromid aufgelöst werden. Unter Bezugnahme auf die Figuren 11C und 11D verbessert die Anwesenheit von Äthidiumbromid die Separationseffizienz (Spitzenschärfe) und -empfindlichkeit (Spitzenhöhe).

Zusätzlich zu den verschiedenen oben besprochenen Faktoren können die relativen Geschwindigkeiten von elektroosmotischem Fluß und Fragmentmigration selektiv durch folgendes eingestellt werden:

a. Änderung der elektrischen Feldstärke. Theoretisch ist bei elektrischen Feldstärken unter 200 v/cm das elektrische Feld E direkt proportional zur Größe der Hauptflußgeschwindigkeit e und den Migrationsgeschwindigkeiten kleiner geladener Partikel durch eine polymerfreie Lösung. Angesichts der Tatsache, daß die Reihenfolge der Fragmentelution mit Polymer (Fig. 4) umgekehrt zu der ohne Polymer (Fig. 5) ist, ist die Migration von DNS durch eine Polymerlösung offensichtlich komplizierter als dieses Modell. Angesichts dieser Tatsache können größen-selektive Änderungen in resultierenden Migrationsgeschwindigkeiten dadurch erreicht werden, daß die elektrische Feldstärke eingestellt wird, besonders im Bereich über 200 v/cm.

b. Änderung der Ladungsdichte der Röhrchenwände. Das Zeta-Potential der elektrischen Doppelschichten der Säule aus Polymerlösung im Röhrchen und das der Fragmente in der Polymerlösung können unabhängig voneinander variiert werden, z.B. durch Behandlung der Röhrchenoberfläche zur Abschirmung von Ladungsgruppen oder durch Einstellen des pH-Werts der Polymerlösung auf selektives Protonieren der

Ladung der Röhrchenwand oder der Fragmente nukleider Säuren.

5 d. Änderung der Lösungsviskosität. Obwohl theoretisch zu erwarten wäre, daß die Viskositätsänderung den elektroosmotischen Fluß und die Migrationsgeschwindigkeit der Partikel gleichermaßen beeinflussen würde, trifft diese Voraussage für große anionische gelöste Stoffe, z.B. Fragmente nukleider Säuren, wahrscheinlich nicht zu. Die
10 Lösungsviskosität könnte durch Änderung der Konzentration des Polymers (was gezeigt wurde, um die Migrationsgeschwindigkeit der Fragmente selektiv zu ändern), durch Zugabe von Polymeren oder anderen Arten gelöster Stoffe, die nicht mit den Fragmenten nukleider Säuren interagieren, und/oder durch Änderung der Lösungstemperatur eingestellt werden.
15

In Zusammenfassung des oben Gesagten bietet die Erfindung eine Vielzahl von Parametern, die selektiv variiert werden können, um die Fraktionierung nukleider Säuren von
20 ausgewählter Größe zu verbessern, entweder durch selektive Änderung der elektroosmotischen Flußgeschwindigkeit in Richtung des kathodischen Behälters oder durch differentiale Änderung der stromaufwärtigen Migrationsgeschwindigkeiten der fraktionierten Fragmente. Wie oben besprochen kann die elektroosmotische Flußgeschwindigkeit relativ zur Gegenmigration von Fragmenten nukleider Säuren durch Änderung der Ladungsdichte negativ geladener Gruppen an der Innenwand des Röhrchens variiert werden. Die
25 Migrationsgeschwindigkeit der Fragmente in anodische Richtung kann für große Fragmente selektiv verringert werden, indem die Polymerkonzentration gesenkt wird und/oder gemäß der Art von Polymer. Für kürzere Fragmente können die Geschwindigkeiten der Gegenmigration selektiv
30 erhöht werden, indem die Fragmente mit einem nicht-ioni-

35

schen Zwischenmittel zusammengesetzt werden. Solche Variationen in Fluß- und Migrationsgeschwindigkeit unterliegen dem Zwang, daß der elektroosmotische Fluß schneller sein muß, als die stromaufwärtige Migrationsgeschwindigkeit der kleinsten zu fraktionierenden Fragmente.

D. Separation im pulsierenden Feld

Die oben beschriebenen elektrophoretischen Verfahren wurden in einem konstanten Spannungsfeld durchgeführt. In Übereinstimmung mit einem anderen Aspekt der Erfindung kann die Fraktionierung von Fragmenten nukleider Säuren durch Durchführung der elektrophoretischen Separation in einem pulsierenden Spannungsfeld verbessert werden, bei einer Frequenz, mit der die Separation innerhalb eines bestimmten Fragmentgrößenbereichs selektiv verbessert werden kann.

Theoretisch kann die Migrationsgeschwindigkeit von Fragmenten nukleider Säuren in einem pulsierenden Feld durch zwei größenbezogene Wirkungen reguliert werden. Die erste Wirkung ist ein Resonanzeffekt, der die Rotationsmodi der Fragmente und die Frequenz des elektrischen Felds betrifft. Tabelle I zeigt Rotations- und Streckresonanzfrequenzen, die für doppelsträngige DNS-Fragmente mit 100, 1.000 und 10.000 Basenpaaren berechnet wurden. Die Rotationsresonanzfrequenzen in Hz wurden auf der Basis eines gestreckten Rotationsellipsoidmodells des Duplexmoleküls berechnet (Cantor).

Tabelle I

<u>Modell</u>	<u>Fragmentgröße (Basenpaare)</u>		
	<u>100</u>	<u>1.000</u>	<u>10.000</u>
5 Gestrecktes Rotationsellipsoid (Drehbewegung)	$9,9 \times 10^4$	$1,6 \times 10^2$	$2,2 \times 10^{-1}$
Viskoelastisch (Streckbewegung)	$3,8 \times 10^5$	$8,1 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$

10 Ein starker Rotationsresonanzeffekt läßt vermuten, daß die Migrationsgeschwindigkeiten von Fragmenten, die mit dem elektrischen Feld in Resonanz sind, bevorzugt gegenüber der Migrationsgeschwindigkeit in einem zeitunabhängigen Feld verlangsamt werden. Der Grund dafür ist, daß von einem Molekül in Rotationsresonanz mit dem elektrischen Feld erwartet würde, daß es im Durchschnitt am wenigsten vorteilhaft für die Migration in Richtung des Feldes ausgerichtet wäre, wenn das elektrische Feld am größten ist. Von größeren Molekülen wäre aufgrund ihrer langsameren Rotationszeiten zu erwarten, daß sie bei jedem Spannungsimpulszyklus weniger von ihren feldorientierten Positionen gestört werden; kleinere Moleküle mit ihren schnelleren Reaktionszeiten würden sich schneller wieder in Richtung des Feldes ausrichten. Wenn also die Rotationsresonanzeffekte dominant sind, sollte es möglich

15 sein, die Migration von Resonanzarten während der Elektrophorese relativ zur elektroosmotischen Flußgeschwindigkeit und der Migrationsgeschwindigkeit nichtresonanter Arten zu verlangsamen.

20 Die zweite größenabhängige Wirkung, die in einem pulsierenden Feld zu erwarten wäre, ist eine Trägheitswirkung aufgrund der Beschleunigung und Verlangsamung von Fragmenten in einer Flüssigkeit bei jedem Spannungsimpuls. Diese Wirkung ist in Fig. 12 dargestellt, die hypotheti-

sche Geschwindigkeitskurven für relativ kleine (gepunktete Linien) und relativ große (Strich-Punkt-Linien) Fragmente nukleider Säuren im Verhältnis zu einer angelegten Rechteckspannung mit einer Impulsbreite und einer maximalen Spannung V_{\max} zeigt. Die maximale Geschwindigkeit, die die Fragmente erreichen sollten, ist die End- oder Dauerzustandsgeschwindigkeit der Fragmente in einem konstanten Spannungsfeld mit potentieller V_{\max} , d.h. 100% der konstanten Feldmigrationsgeschwindigkeit.

Wie aus der Figur ersichtlich ist, wird von kleineren Fragmenten erwartet, daß sie nach Anlegen des Spannungsimpulses die Endgeschwindigkeit schneller als große erreichen, aber im wesentlichen mit derselben Geschwindigkeit auf Nullspannung verlangsamen, wenn der Spannungsimpuls endet. Da der Gesamtweg, den jedes Fragment während eines Spannungsimpulses zurücklegt, genau das Integral der Geschwindigkeitskurve ist, wird von den Migrationsgeschwindigkeiten größerer Fragmente erwartet, daß sie vorzugsweise in einem Impulsspannungsfeld abnehmen. Es kann auch angenommen werden: Je höher die Impulsfrequenz ist und je kürzer die Impulsdauer, desto kleiner ist die Fragmentgröße, die vorzugsweise in ihrer Migrationsgeschwindigkeit verlangsamt werden kann, da die Wirkung jeder Verzögerung in der Geschwindigkeitskurve durch kurze Impulse betont wird.

Die Strich-Punkt-Aufzeichnung in Fig. 13 zeigt die erwartete Wirkungsbeziehung zwischen Migrationsgeschwindigkeit, ausgedrückt als prozentualer Anteil der Migrationsgeschwindigkeit in einem konstanten Spannungsfeld, und Molekulargewicht der Fragmente bei einer bestimmten Impulsfrequenz. Die Aufzeichnung wurde vereinheitlicht, um konstante Spannungswerte auf RMS-Spannung in einem pulsierenden Feld zu korrigieren. Die Strich-Punkt-

Aufzeichnung zeigt eine steigende Migrationsgeschwindigkeit mit abnehmender Partikelgröße, wie von dem gerade besprochenen Trägheitsmodell vorausgesagt. Bei einigen kleinen Fragmentgrößen, bei denen die Geschwindigkeitskurven der Fragmente einer gemeinsamen Obergrenze zustreben, nähert sich die Migrationsgeschwindigkeit 100% der Migration in einem konstanten Spannungsfeld. Von der Kurve in Fig. 13 würde man daher erwarten, daß sie an diesem Punkt abflacht, wie von der gepunkteten Linie angegeben.

Fig. 14 ist ein Elektropherogramm einer Mischung aus doppelsträngigen Fragmenten, die in einem bei 650 Hz pulsierenden Feld fraktioniert werden. Das Probenmaterial und die Fraktionierungsbedingungen sind denen bei der in Fig. 4 gezeigten Fraktionierung ähnlich, bis auf die Art des angelegten elektrischen Felds, wie in Beispiel 9 genau beschrieben. Die Migrationsgeschwindigkeiten von Fragmenten derselben Größe wurden von den Spitzenzeiten in den beiden Figuren gemessen und mit den in Tabelle 2 unten dargestellten Ergebnissen verglichen. Spalte A der Tabelle gibt die Größe der verglichenen Fragmente in Basenpaaren an, und Spalte B die Differenz der Migrationszeit zur Erfassungszone, korrigiert um die relativen Laufzeiten der Vorderkante der beiden Durchgänge, zwischen $v(\text{konstant})$, der Geschwindigkeit in einem konstanten Spannungsfeld, und $v(\text{impuls})$, der Geschwindigkeit in einem pulsierenden Feld. Die Geschwindigkeitsdifferenzen zwischen entsprechenden Fragmenten sind in $\text{cm/min} \times 10^{-4}$ ausgedrückt. Ein positiver Wert in Spalte B bedeutet, daß das Fragment eine geringere Migrationsgeschwindigkeit in einem konstanten Spannungsfeld als in einem pulsierenden Feld hat. Für Fragmente mit einer Größe über 1 Kilobase nähert sich der Wert $v(\text{impuls})$ mit abnehmender Größe dem Wert $v(\text{konstant})$, wie von der Aufzeichnung in Fig. 13 vorausgesagt.

Bei kleineren Fragmenten flacht die Differenz zwischen $v(\text{konstant})$ und $v(\text{impuls})$ jedoch nicht bei einem Wert Null ab, wie nach dem Trägheitsmodell zu erwarten wäre, sondern nimmt mit kleineren Fragmenten zunehmend negative Werte an. Die größere Migrationsgeschwindigkeit in einem pulsierenden Feld würde anzeigen, daß über dem 100%-Kreuzungspunkt die anziehende Interaktion zwischen den kleineren Fragmenten und dem Polymer tatsächlich verringert werden, was die Bewegung der Fragmente durch die Polymermatrix erleichtert. In jedem Fall bietet dieses Merkmal eine höhere Auflösung kleinerer Fragmente über dem Kreuzungspunkt als unter ähnlichen Bedingungen in einem konstanten Spannungsfeld erreicht werden können.

Tabelle II

	A	B
	Fragmentgröße (Basenpaare)	$v(\text{konstant})$ $-v(\text{impuls})$
20	2036	4,0E-04
	b	4,1E-04
	a	1,5E-04
	1018	0,71E-04
	396	-3,8E-04
	344	-3,9E-04
	298	-4,5E-04
	220	-5,1E-04
	201	-5,2E-04
	154	-5,6E-04
25	134	-5,5E-04
	75	-6,9E-04

Aus dem vorangegangenen wird angenommen, daß die Auflösung innerhalb kleinerer Fragmente selektiv verbessert werden kann, indem die elektrophoretische Separation in einem Impulsspannungsfeld durchgeführt wird, bei einer Frequenz, die die Migrationsgeschwindigkeit größerer Fragmente selektiv verzögert und die Migrationsgeschwindigkeit kleinerer Fragmente erhöht.

Bei einigen Mischungen aus Fragmenten nukleider Säuren, besonders wenn die Fraktionierung von Arten in verschiedenen Größenbereichen gewünscht wird, können die oben besprochenen Variablen - einschließlich pH-Wert der Lösung, Art und Konzentration des Polymers und Feldfrequenz - während des elektrophoretischen Durchgangs selektiv variiert werden, um die Fragmentauflösung zu verbessern. Eine elektrophoretische Separation kann anfangs in einem konstanten Feld oder mit einer niedrigen Frequenz durchgeführt werden, um größere Fragmente aufzulösen, dann auf eine höhere Frequenz umgeschaltet werden, um die Auflösung kleinerer Fragmente zu verbessern. Als weiteres Beispiel können der pH-Wert oder die Polymerkonzentration der Polymerlösung während eines elektrophoretischen Durchgangs ständig variiert werden, wobei eine normale Zweikammer-Mischvorrichtung verwendet wird, um ein kontinuierliches Lösungsgefälle zu erzeugen, das in das Kapillarröhrchen gezogen wird.

20 E. Anwendungen

Das Fraktionierverfahren der Erfindung ist für alle oben erwähnten Anwendungen nützlich, die die größenabhängige Fraktionierung ein- oder zweisträngiger nukleider Säuren erfordern. Zu diesen Anwendungen gehören die elektrophoretische Separation für die Restriktionsanalyse, einschließlich Analyse von Polymorphismen von Restriktionsfragmentlänge für genetische Suchtests, die bestätigende Vektorkonstruktion, die Identifikation spezieller Fragmente nukleider Säuren auf Größenbasis und/oder Hybridisierung zu Proben nukleider Säuren sowie die Fraktionierung einsträngiger Fragmente für chemische oder enzymatische Sequenzierung.

Die folgenden beiden Anwendungen zeigen, wie das Verfahren zur Analyse von Restriktionsfragmenten und als Teil eines automatischen Sequenzierprotokolls verwendet werden kann. Im Beispiel der Restriktionsanalyse soll aus einer Mischung genomischer Fragmente ein Restriktionsfragment identifiziert werden, das eine Zielsequenz von Interesse enthält. Nach Aufschließen der genomischen Mischung mit einem oder mehreren ausgewählten Restriktionsenzymen wird die Fragmentmischung unter Hybridisierungsbedingungen mit einer meldermarkierten Probe verbunden, die mit der Zielsequenz hybridisieren kann. Die Probe umfaßt vorzugsweise die komplementäre Zielsequenz und eine kovalent gebundene Fluoreszenzprobe, die leicht von einem Fluoreszenzprobendetektor erfaßt werden kann. Die Probe kann mit den Fragmenten hybridisiert werden, beispielsweise durch normale Denaturierungs-/Renaturierungsbedingungen für einsträngige Arten oder durch eine mit RecA katalysierte Triplex-Bildung an die Fragmente in doppelsträngiger Form gebunden werden.

Nach Bindung der Probe an die Fragmente wird die Probe gemäß dem vorliegenden CMCE-Verfahren fraktioniert. Der Detektor wird vorzugsweise in einem Doppelwellenlängenmodus betrieben, bei dem UV-Absorptions- und Fluoreszenzemissionserfassung gleichzeitig durchgeführt werden. Fig. 15 zeigt ein exemplarisches Elektropherogramm der Fragmentmischung, bei der die UV-Absorption durch eine durchgehende Linie und die Fluoreszenzemission durch eine gepunktete Linie dargestellt werden. Das Restriktionsfragment, das die ausgewählte Zielsequenz enthält, wird leicht durch das zugehörige Fluoreszenzsignal identifiziert.

Alternativ können die Fragmente von Interesse zu einer biotinbeschichteten Probe hybridisiert werden, durch Bin-

dung an einen Avidin-Festträger selektiv isoliert und dann vor der CMCE-Fraktionierung vom Träger abgenommen werden.

5 Für die DNS-Sequenzanalyse ist es erforderlich, einsträngige Oligomere aufzulösen, die sich voneinander um eine nukleotide Basis unterscheiden. Die Fähigkeit des vorlie-
 10 genden Verfahrens, eine Auflösung dieser Art zu erzielen, ist in Fig. 16 abgebildet, die ein Elektropherogramm für eine Mischung aus polyA-Oligonukleotiden zeigt, die alle Basenpaarlängen zwischen 40 und 60 Basenpaaren enthalten. Die Figur zeigt, daß alle 20 der verschieden großen Oligomere gut aufgelöst werden. Eine ähnliche Auflösung von Oligomeren wurde auch im Basenpaarbereich zwischen 19 und
 15 22 erzielt, wie in Beispiel 10 genauer beschrieben ist.

Die zur Sequenzierung verwendeten Oligomere können nach dem Dideoxy-Enzym-Verfahren (Sanger) oder dem chemischen Abspaltungsverfahren (Maxam-Gilbert) hergestellt werden.
 20 Die oligonukleotiden Fragmente aus den vier einzelnen Reaktionsmischungen werden fraktioniert, vorzugsweise parallel, und die Fragmentspitzen aus jedem der vier Röhrchen werden aufgezeichnet. Fig. 17A-17D zeigen oligonukleotide Elektropherogramme aus den A-, T-, G-, C-terminierten Fragmenten, die für die nukleotide Sequenz beobachtet wurden, die oben in der Figur gezeigt ist. Die automatische oder halbautomatische Analyse der Spitzenpositionen und die Konstruktion der Sequenz können mit normal programmierten Systemen durchgeführt werden.

30 Alternativ kann die oligonukleotide Fraktionierung in einem einzigen Röhrchen durchgeführt werden, indem beispielsweise das von Smith beschriebene Fluoreszenz-Markierverfahren verwendet wird.

35

Die folgenden Beispiele zeigen verschiedene Separationsverfahren und -anwendungen in Übereinstimmung mit der Erfindung, sollen ihren Geltungsbereich jedoch keineswegs einschränken.

5

Beispiel 1

CMCE in Polymer mit 0,25% HPMC im konstanten Feld

10

Die kapillare Elektrophorese in Gegenmigration (CMCE) wurde mit einem kapillaren Elektrophoresesystem von ABI, Modell 270, durchgeführt. Das System umfaßt eine eingebaute Hochspannungs-Gleichstromquelle, die für Spannungseinstellungen bis zu 30 kV geeignet ist. Das im System verwendete Kapillarröhrchen ist aus geschmolzenem Siliziumdioxid, 72 cm lang, hat einen Innendurchmesser von 50 µm und einen Außendurchmesser von 350 µm. Es wurde von Polymicro Technologies (Phoenix, AZ) bezogen.

15

20

Der geerdete kathodische Behälter wird mit Tris-Borat-EDTA-Puffer gefüllt, der 10 mM Tris-Borat, pH-Wert 8,3, 5 mM NaCl, 0,1 mM EDTA und 7 M Harnstoff (TBE-Puffer) enthält. Der anodische Behälter enthält eine Polymerlösung mit 0,25 Gew.-% Hydroxypropylmethylzellulose (HPMC) in TBE-Puffer. Das Polymer, das durch eine Viskosität von ca. 4 Pa (4.000 centipoise) in einer Lösung mit 2 Gew.-% bei Raumtemperatur gekennzeichnet ist, wurde von Dow Chemical (Midland, MI) bezogen.

25

30

Das Röhrchen wurde mit mehreren Säulenvolumina von 1 M NaOH, dann 100 mM NaOH gewaschen und schließlich mit mehreren Volumina der Polymerlösung gespült, indem die Wasch- und Spüllösungen durch ein an das kathodische Ende des Röhrchens angelegtes Vakuum durch das Röhrchen gezogen werden. Eine Mischung aus DNS-Restriktionsfragmenten, die von BRL (Bethesda, MD) bezogen wurde, enthielt eine Kombination aus 1 kB Leiter-Teilrestriktionsfragmenten

35

(Vielfache von ca. 1 kB) und kleinere HinfI-Aufschlußfragmente im Größenbereich zwischen 50 und 1.000 Basenpaaren. Die Fragmentmischung wurde mit Wasser auf eine Endkonzentration der DNS von ca. 250 µg/ml verdünnt. Ca. 2 nl der DNS-Lösung wurden durch ein an das kathodische Ende des Röhrchens angelegtes Vakuum in das anodische Ende des Röhrchens gezogen. Das Röhrchen wurde dann erneut in die Polymerlösung getaucht.

Das elektrophoretische System wurde bei einer Spannungseinstellung von ca. 20 kV (ca. 400 V/cm) während des Durchgangs betrieben. Die UV-Erfassung erfolgte mit einem Kratos 783 UV-Detektor für Kapillarröhrchenerfassung. Das Ausgangssignal des Detektors wurde integriert und auf einem HP-Integrator/Plotter, Modell 3396A, aufgezeichnet.

Das erhaltene Elektropherogramm ist in Fig. 4 abgebildet. Die gesamte Laufzeit betrug ca. 11 Minuten. Die Größen der Fragmente in der fraktionierten Mischung, ausgedrückt in der Anzahl ihrer Basenpaare, sind fett gedruckt. Wie zu sehen ist, separierte das Verfahren wirksam Fragmente im Bereich von 75 bis ca. 3.000 Basenpaaren und ergab deutliche Spitzen für Fragmente im Bereich zwischen 3.000 und 6.000 Basenpaaren. Die Molekulargewichte der Fragmente wurden durch bekannte Standards bestätigt.

Beispiel 2

CMCE ohne Polymer im konstanten Feld

Das in Beispiel 1 beschriebene elektrophoretische Verfahren wurde befolgt, mit dem Unterschied, daß die für die Fragmentseparation verwendete TBE-Pufferlösung kein Polymer enthielt und die Spannungseinstellung ca. 800 V/cm betrug. Das Elektropherogramm des fraktionierten DNS-Materials ist in Fig. 5 abgebildet. Im Gegensatz zu den

Elektropherogrammen in Fig. 4 bewegten sich die kleinsten Fragmente am schnellsten zur Kathode, was anzeigt, daß sich die kleinsten Fragmente tatsächlich am langsamsten stromaufwärts zur Kathode bewegten. Es gibt keine bedeutende Auflösung innerhalb der Fragmenten bis auf breite Größenbereiche, und die Elutionsspitzen aller Fragmente lagen dicht nebeneinander.

Beispiel 3

10 CMCE mit 0,1% HMPC im konstanten Feld

Das in Beispiel 1 beschriebene elektrophoretische Verfahren wurde eingesetzt, mit dem Unterschied, daß die für die Fragmentseparation verwendete Polymerlösung 0,1 Gew.-% HPMC enthielt. Das Elektropherogramm des fraktionierten DNS-Materials ist in Fig. 6 dargestellt. Aus dieser Figur wird ersichtlich, daß die geringere Polymerkonzentration eine gute Spitzenauflösung bis zu Fragmentgrößen von ca. 10 kB ermöglichte, mit einem geringen Auflösungsverlust von Fragmenten mit weniger als ca. 500 Basenpaaren.

Beispiel 4

CMCE in Polymer mit 0,25% HEC im konstanten Feld

25 Das in Beispiel 1 beschriebene elektrophoretische Verfahren wurde eingesetzt, mit dem Unterschied, daß die für die Fragmentseparation verwendete TBE-Polymerlösung 0,25 Gew.-% Hydroxyethylzellulose (HEC) enthielt. Das HEC-Polymer wurde von Dow Chemical (Midland, MI) bezogen und
30 hatte eine Viskosität von ca. 0,3 Pa (300 centipoise) in einer 2%igen Lösung bei Raumtemperatur. Das Elektropherogramm des fraktionierten DNS-Materials ist in Fig. 7 dargestellt. Interessanterweise zeigt das Elektropherogramm eine Auflösung von Leiterspitzen im Größenbereich 2.000-
35 8.000 kB, bei schärferer Auflösung der kleinsten Spitzen

im Vergleich zur Separation mit 0,25% HMPC, die in Fig. 4 dargestellt ist. Ähnliche Ergebnisse wurden durch CMCE-Fraktionierung in 0,1% HEC erzielt, obwohl die Auflösung von Arten mit hohem und niedrigem Molekulargewicht bei der höheren Polymerkonzentration besser war. Polymerlösungen aus Methylzellulose (MC), einschließlich 0,25 Gew.-% MC ergaben eine sehr gute Auflösung der kleineren Fragmente (weniger als 500 Basenpaare).

Beispiel 5

CMCE in Polymer mit 1% Dextran im konstanten Feld

Das in Beispiel 1 beschriebene elektrophoretische Verfahren wurde eingesetzt, mit dem Unterschied, daß die für die Fragmentseparation verwendete TBE-Polymerlösung 1% Dextran enthielt. Das Polymer wurde von Sigma (St. Louis, MO) bezogen und hatte ein durchschnittliches Molekulargewicht von ca. 150.000. Das Elektropherogramm des fraktionierten DNS-Materials ist in Fig. 8 dargestellt. Die Fragmente wurden in dieser Polymerlösung weniger gut aufgelöst als in HMPC- oder HEC-Polymeren.

Beispiel 6

CMCE in Polymer mit 1,5% PVA im konstanten Feld

Das in Beispiel 1 beschriebene elektrophoretische Verfahren wurde eingesetzt, mit dem Unterschied, daß die für die Fragmentseparation verwendete TBE-Polymerlösung 1,5% Polyvinylalkohol (PVA) enthielt. Das Polymer, das durch ein durchschnittliches Molekulargewicht von ca. 125 Kilo-dalton und ca. 88% Hydroxylation gekennzeichnet ist, wurde von Scientific Polymer Products (Ontario, New York) bezogen. Das Elektropherogramm des fraktionierten DNS-Materials ist in Fig. 9 dargestellt. Die im Fragmentgrößenbereich unter ca. 1 kB erzielte Auflösung stimmte un-

gefähr mit der überein, die bei CMCE mit 0,1% HPMC (Fig. 6) beobachtet wurde. Fragmente im Bereich von 1036 Basen und größer wurden nicht bedeutend aufgelöst.

5

Beispiel 7

CMCE in 0,25% HPMC plus Äthidiumbromid im konstanten Feld

10

Die DNA-Leiterfragmentmischung aus Beispiel 1 wurde mit Äthidiumbromid auf eine Endkonzentration von 10 μM Äthidiumbromid gemischt. Die CMCE-Polymerlösung war ein TBE-Puffer mit Polymer mit 0,25% HPMC und 10 μM Äthidiumbromid. Die CMCE-Fraktionierung wurde wie in Beispiel 1 durchgeführt; die Ergebnisse sind in Fig. 10 dargestellt. Ein Vergleich dieser Figur mit Fig. 4 zeigt eine wesentlich größere Auflösung von Fragmenten im Größenbereich bis zu 1-2 kB und einen geringen Auflösungsverlust bei höheren Molekulargewichten in bezug auf die CMCE-Fraktionierung ohne Zwischenmittel.

15

20

25

Eine ähnliche elektrophoretische Separation wurde an denselben partiellen Aufschlußfragmenten durchgeführt, die in einer Polymerlösung mit 2,6 μM Akridinorange zubereitet wurden. Die Ergebnisse waren denen ähnlich, die mit Äthidiumbromid erzielt wurden, und zeigten eine verbesserte Auflösung von Arten mit geringerem Molekulargewicht.

Beispiel 8

Vergleich von erzielter Separation mit 0,25% mit und ohne Äthidiumbromid

30

Teilmengen von DNS-Leiterfragmentmischungen mit $\phi\text{X174/HaeIII}$ mit (A) und ohne (B) 0,5 μM Äthidiumbromid und $\phi\text{X174/HaeIII}$ plus 611 Basenpaare PCR-Fragmente mit

35

(C) und ohne (D) 0,5 μ M Äthidiumbromid wurden zubereitet. Die CMCE-Polymerlösung war ein TBE-Puffer mit 0,5% HEC-Polymer und 0,5 μ M Äthidiumbromid.

5 Die CMCE-Fraktionierung wurde mit den Teilmengen A-D wie in Beispiel 1 durchgeführt; die Ergebnisse sind in Fig. 11A-11D dargestellt. Das Elektropherogramm in Fig. 11A zeigt eine deutliche Auflösung der Fragmente mit 281 und 271 Basenpaaren, im Gegensatz zu denselben Fragmenten,
 10 die ohne Äthidiumbromid (Fig. 11B) fraktioniert wurden. Ähnlich zeigt das Elektropherogramm in Fig. 11C eine deutliche Auflösung der Fragmente mit 281 und 271 Basenpaaren (in der ϕ X174-Leitermischung) und der Fragmente 611 und 603 (in der PCR-Fragmentmischung) i, im Gegensatz
 15 zu denselben Fragmenten, die ohne Äthidiumbromid (Fig. 11D) fraktioniert wurden.

Beispiel 9

Elektrophoretische Separation im pulsierenden Feld

20

25

30

35

Die Mischung der partiellen Aufschluß-DNS-Leiterfragmente und HinfI-Fragmente aus Beispiel 1 wurde wie in Beispiel 1 in das kathodische Ende eines Kapillarröhrchens gefüllt. Eine pulsierende Spannung wurde mit einem HP 3314A-Funktionsgenerator (zur Erzeugung einer Rechteckwelle), einem Verstärker von Krohn-Hite, Modell 7500, und einem Hochspannungsumwandler Jefferson Electric erzeugt. Die angelegte Spannung hatte eine Spitzenspannung von ca. 25 kV und eine RMS-Spannung von ca. 12,5 kV, was eine angelegte RMS-Spannung von ca. 170 V/cm und eine Impulsfrequenz von 650 Hz ergab. Die Stromquelle wurde ca. 45 Minuten lang in einem Impulsspannungsmodus betrieben, danach befand sich die Vorderkante der Fraktioniermischung genau stromaufwärts der Erfassungszone. Die Strom-

quelle wurde dann bis zum Ende der elektrophoretischen Separation in einen Gleichspannungsmodus mit ca. 12,5 V/cm umgeschaltet.

5 Das mit dem Verfahren erhaltene Elektropherogramm ist in Fig. 14 dargestellt. Die Größe der Fragmente in der fraktionierten Mischung, ausgedrückt in Basenpaaren, ist fett gedruckt. Die erhaltenen Spitzenpositionen wurden mit denen in Fig. 4 verglichen, was Spitzen-Fragmentmigrationszeiten für dieselben Spitzen unter Elektrophoresebedingungen im konstanten Feld ergibt. Die Änderungen bei Spitzenmigrationsgeschwindigkeiten werden als Funktion der Größe oben in bezug auf Tabelle 2 besprochen. Fragmente über 2.000 Basenpaare wandern langsamer in einem pulsierenden Feld, während kleinere Fragmente in bezug auf die vereinheitlichten Migrationsgeschwindigkeiten in einem konstanten Spannungsfeld schneller wandern.

Beispiel 10

CMCE aus einsträngiger DNS im konstanten Feld

20 Eine Mischung aus polyA-Oligonukleotiden mit 40-60 Nukleotiden wurde von Pharmacia (Uppsala, Schweden) bezogen. Die Oligonukleotidmischung wurde in Wasser auf 350 µg/ml aufgelöst. Ca. 2 nl Probenlösung wurden durch ein an das kathodische Ende des Röhrchens angelegtes Vakuum in das anodische Ende des Röhrchens gezogen, und das Material wurde in einem Polymer mit 0,25% HPMC bei einer konstanten Spannung von ca. 140 V/cm fraktioniert. Die gesamte Laufzeit betrug ca. 30 Minuten. Das erhaltene Elektropherogramm ist in Fig. 16 abgebildet. Es ist zu sehen, daß die CMCE-Fraktionierung jedes der 20 Oligomere in der Mischung wirksam aufgelöst hat. Eine Mischung aus kleineren Oligonukleotiden im Größenbereich von 19-22 Basenpaaren wurde mit diesem Verfahren ähnlich aufgelöst.

PATENTANSPRÜCHE

1. Ein Verfahren zur Fraktionierung einer Mischung nukleider Säuren mit unterschiedlichem Molekulargewicht, aufweisend
- 5
- das Laden einer flüssigen Probe, die Fragmente nukleider Säuren enthält, in ein Ende eines Mikrokapillarröhrchen, das mit einer flüssigen Elektrolytlösung
- 10
- gefüllt ist, wobei die Innenwand des Röhrchens negativ geladene Gruppen enthält, ein Ende des Röhrchens wird dabei in Verbindung mit der Flüssigkeit in einem anodischen Behälter gebracht, der eine Polymerlösung aus einem ungeladenen Polymer enthält, das ein Molekulargewicht von mindestens 10.000 Dalton hat, und
- 15
- das andere Ende des Röhrchens wird in Verbindung mit einem kathodischen Behälter gebracht, und
- das Anlegen einer Spannung zwischen dem anodischen
- 20
- und dem kathodischen Behälter, die die Polymerlösung durch elektroosmotischen Fluß in und durch das Röhrchen ziehen kann, bei einer Flußgeschwindigkeit der Flüssigkeit im Röhrchen, die in Richtung des kathodischen Behälters größer ist als die vom Molekulargewicht abhängigen Migrationsgeschwindigkeiten solcher
- 25
- Fragmente nukleider Säuren in Richtung des anodischen Behälters, so daß Fragmente nukleider Säuren mit höherem Molekulargewicht sich schneller in Richtung des kathodischen Behälters bewegen.
- 30
2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Verwendung bei Verbesserung der Fraktionierung von Fragmenten nukleider Säuren mit dem gewählten Molekulargewicht, das außerdem die Regelung der elektroosmotischen Flußgeschwindigkeit der Polymerlösung in Richtung des kathodi-
- 35

- schen Behälters oder der Geschwindigkeit der Fragmentmigration durch die Polymerlösung in Richtung des anodischen Behälters umfaßt, um die Differenz zwischen der Flußgeschwindigkeit und den Migrationsgeschwindigkeiten der Fragmente mit dem gewählten Molekulargewicht zu verringern und dadurch die Nutzlänge des Röhrchens zu vergrößern, über die eine elektrophoretische Migration der Fragmente auftreten kann.
- 5
- 10 3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Regelung eine Verringerung der Konzentration der Polymerlösung umfaßt, um vorzugsweise die Differenz der Fragmentmigrationsgeschwindigkeiten von relativ großen Polymeren durch das Polymer zu erhöhen.
- 15
4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Fragmente doppelsträngig sind und die Regelung das Zufügen eines Zwischenmittels zu den Fragmenten umfaßt, um vorzugsweise die Migrationsgeschwindigkeiten von Fragmenten mit geringerem Molekulargewicht durch die Polymerlösung zu erhöhen.
- 20
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Zwischenmittel aus der Gruppe Äthidiumbromid, Akridinorange und Thiazolorange ausgewählt wird.
- 25
6. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die zwischen den Behältern angelegte Spannung eine pulsierende Spannung ist und die Regelung die Auswahl einer pulsierenden Spannungsfrequenz umfaßt, bei der die Migrationsgeschwindigkeiten der Fragmente mit dem gewählten Molekulargewicht gegenüber den Geschwindigkeiten in einem konstanten elektrischen Feld derselben Feldstärke erhöht werden.
- 30

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Regelung das Anlegen einer pulsierenden Spannung bei einer gewählten Frequenz umfaßt, die die Separation von Fragmenten der gewählten Größe von größeren Fragmenten verbessert, sowie das Anlegen einer pulsierenden Spannung und einer zweiten, unterschiedlichen Frequenz, die die Separation von Fragmenten der gewählten Größe von kleineren Fragmenten verbessert.
- 10 8. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Fragmente nukleider Säuren zwischen 100 und 2.000 Basenpaaren groß sind und die Frequenz der angelegten pulsierenden Spannung ca. 100-500 Hz beträgt.
- 15 9. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Polymer ein hydroxyliertes Polymer mit einem Molekulargewicht von mindestens 50.000 Dalton ist.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das hydroxylierte Polymer ein Polysaccharid ist, dessen Molekulargewicht mindestens ca. 50.000 Dalton beträgt.
- 20 11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das Polymer ein wasserlösliches Zellulosederivat ist.
- 25 12. Verfahren nach Anspruch 1, zur Verwendung bei der Fraktionierung doppelsträngiger Fragmente nukleider Säuren im Größenbereich von ca. 20 bis 5.000 Basenpaaren, das außerdem das Zufügen eines Zwischenmittels zu den Fragmenten vor der Ladung umfaßt.
- 30 13. Verfahren nach Anspruch 1, das außerdem den Nachweis der Anwesenheit von Fragmentbändern an einer bestimmten Position neben dem kathodischen Ende des Röhr-

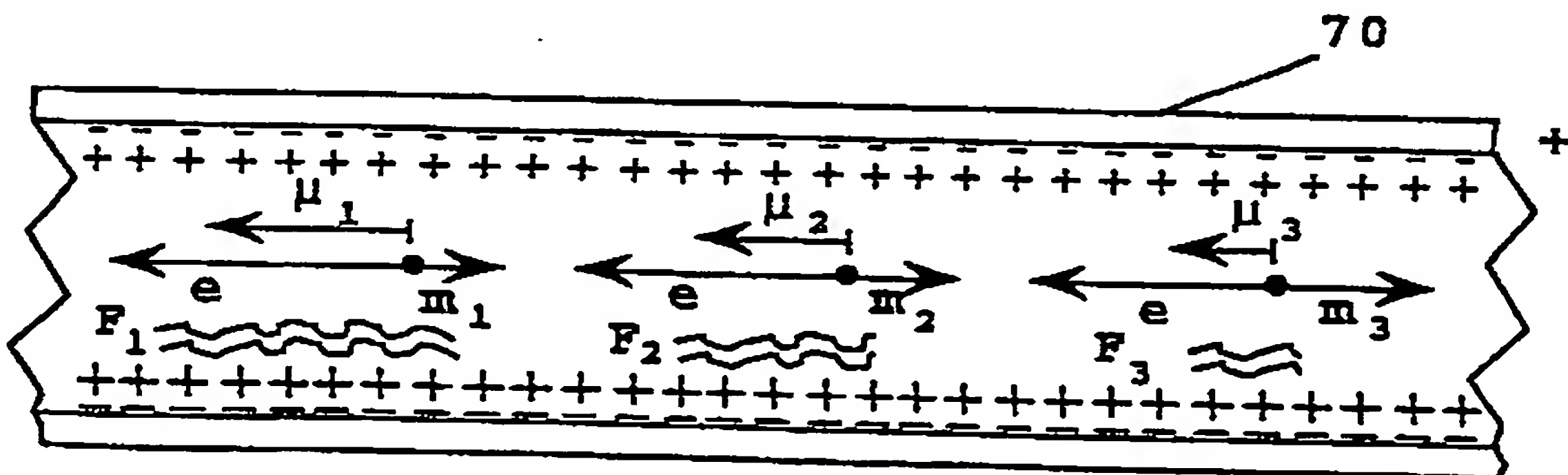
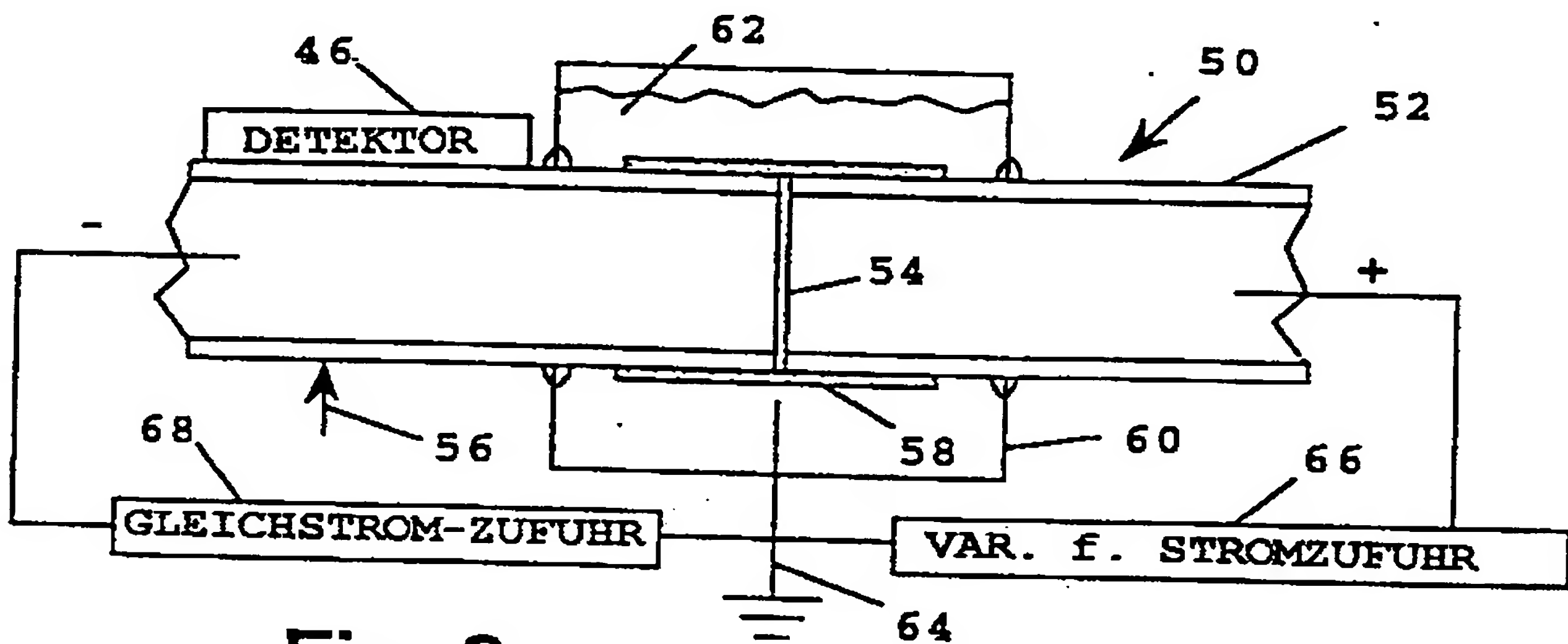
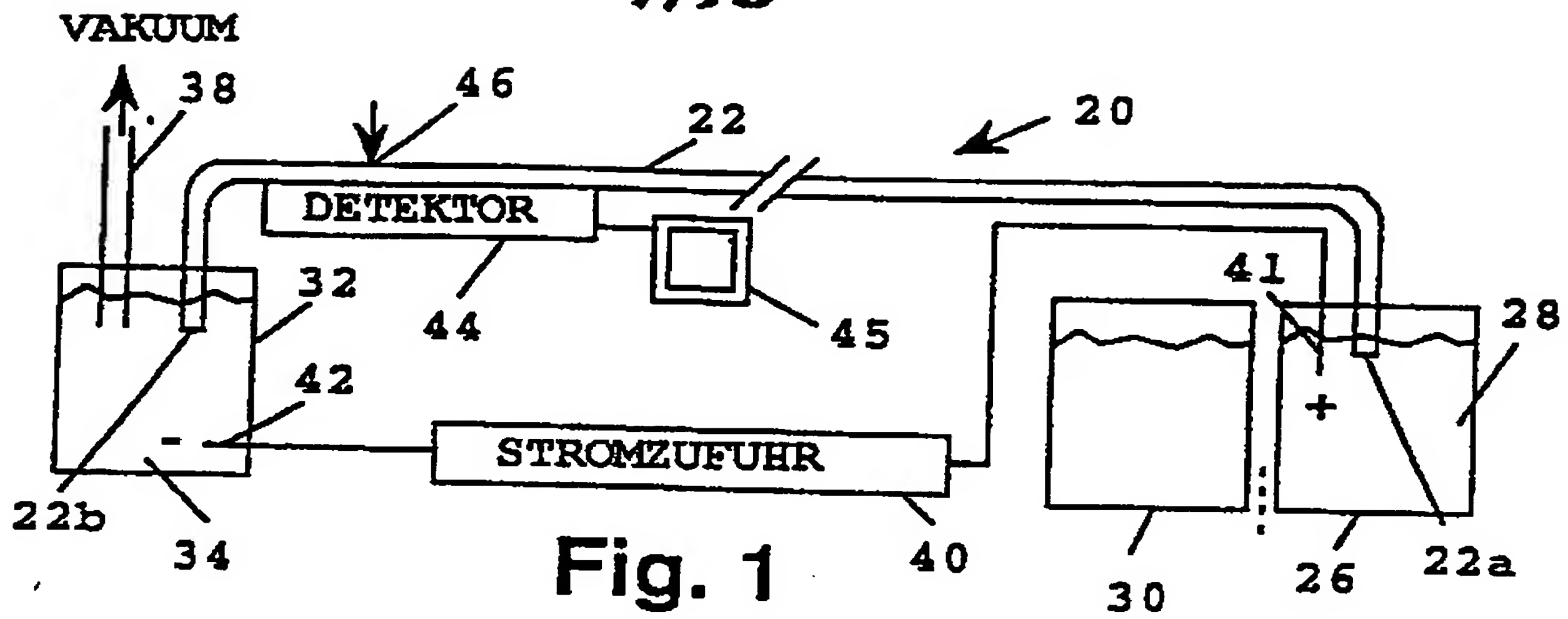
chens umfaßt, indem eine optische Eigenschaft der Fragmente im Röhrchen gemessen wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, zur Verwendung bei der
 5 Durchführung einer Restriktions-Aufschlußanalyse einer DNA-Probe, das außerdem ein Aufschließen der Probe mit einer oder mehr ausgewählten Restriktions-Endonukleasen umfaßt.
- 10 15. Verfahren nach Anspruch 13, zur Verwendung bei der Identifizierung eines Fragments mit einer ausgewählten Zielsequenz von Basispaaren in einer Mischung aus DNA-Fragmenten, das außerdem eine Hybridation des
 15 Fragments mit einer einsträngigen nukleiden Säuresonde umfaßt, die eine Sequenz enthält, die komplementär zur Zielsequenz ist, sowie den Nachweis des Fragments mit der Zielsequenz auf der Basis seiner Bindung an die Sonde.
- 20 16. Verfahren nach Anspruch 13, zur Verwendung bei der Bestimmung eines einsträngigen Fragments nukleider Säuren, das außerdem die Bearbeitung des Fragments
 25 umfaßt, um vier Sätze zufallsbegrenzter Fragmente zu erzeugen, die an einer der Basen der nukleiden Säuren enden, und durch diesen Nachweis die Migrationsgeschwindigkeiten jedes der Fragmente in jedem der vier Fragmentsätze zu bestimmen.

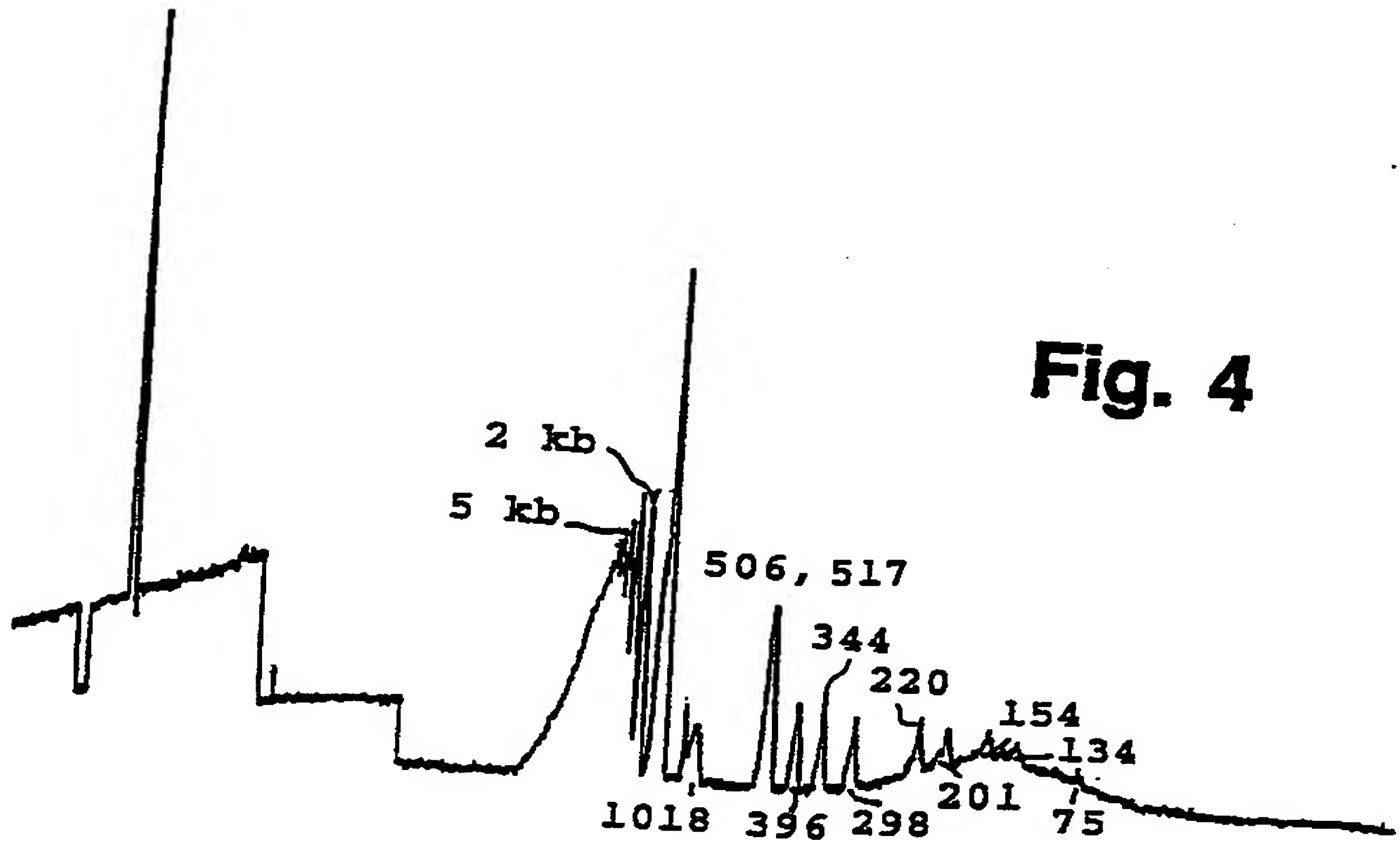
30

35

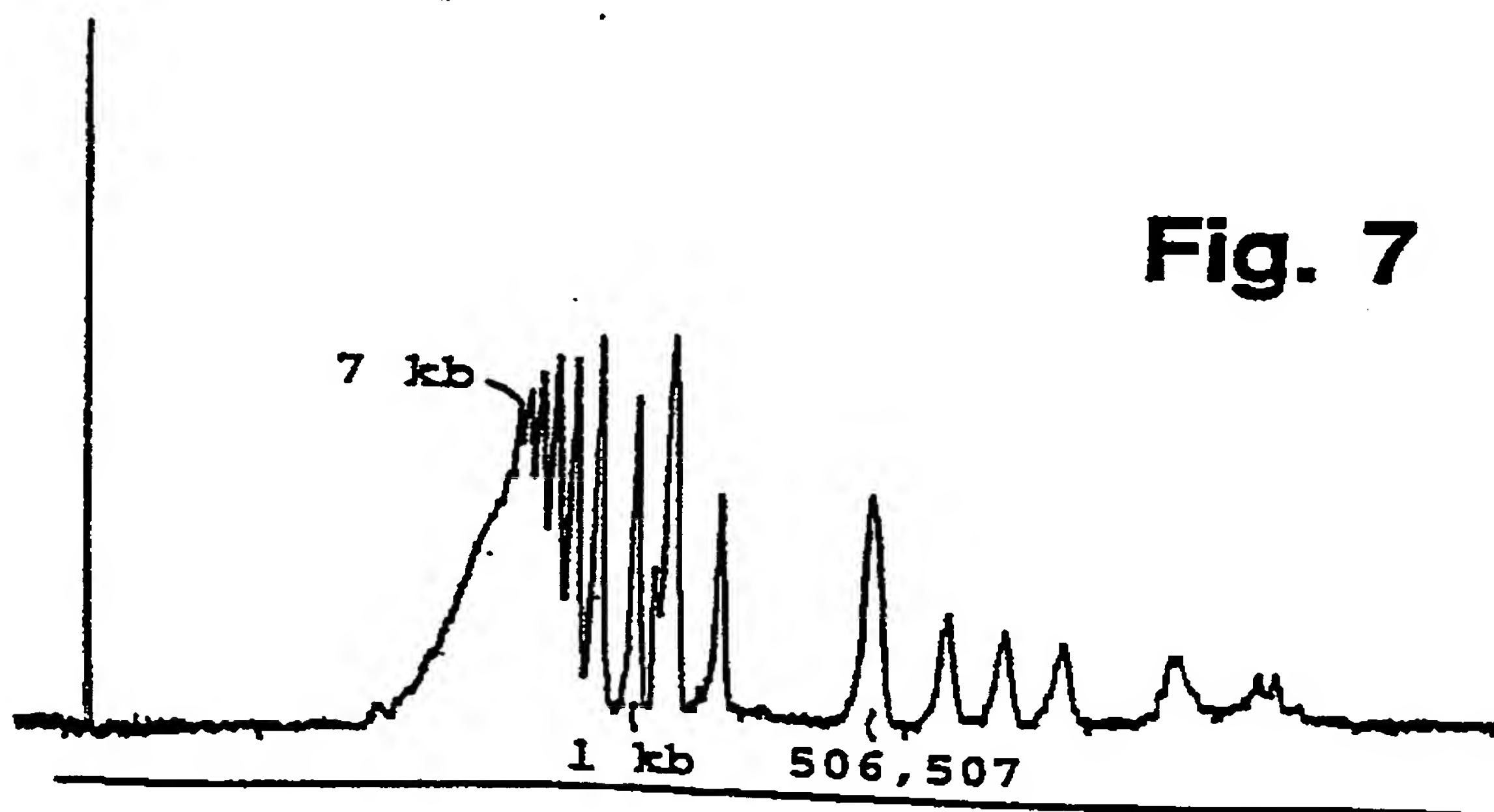
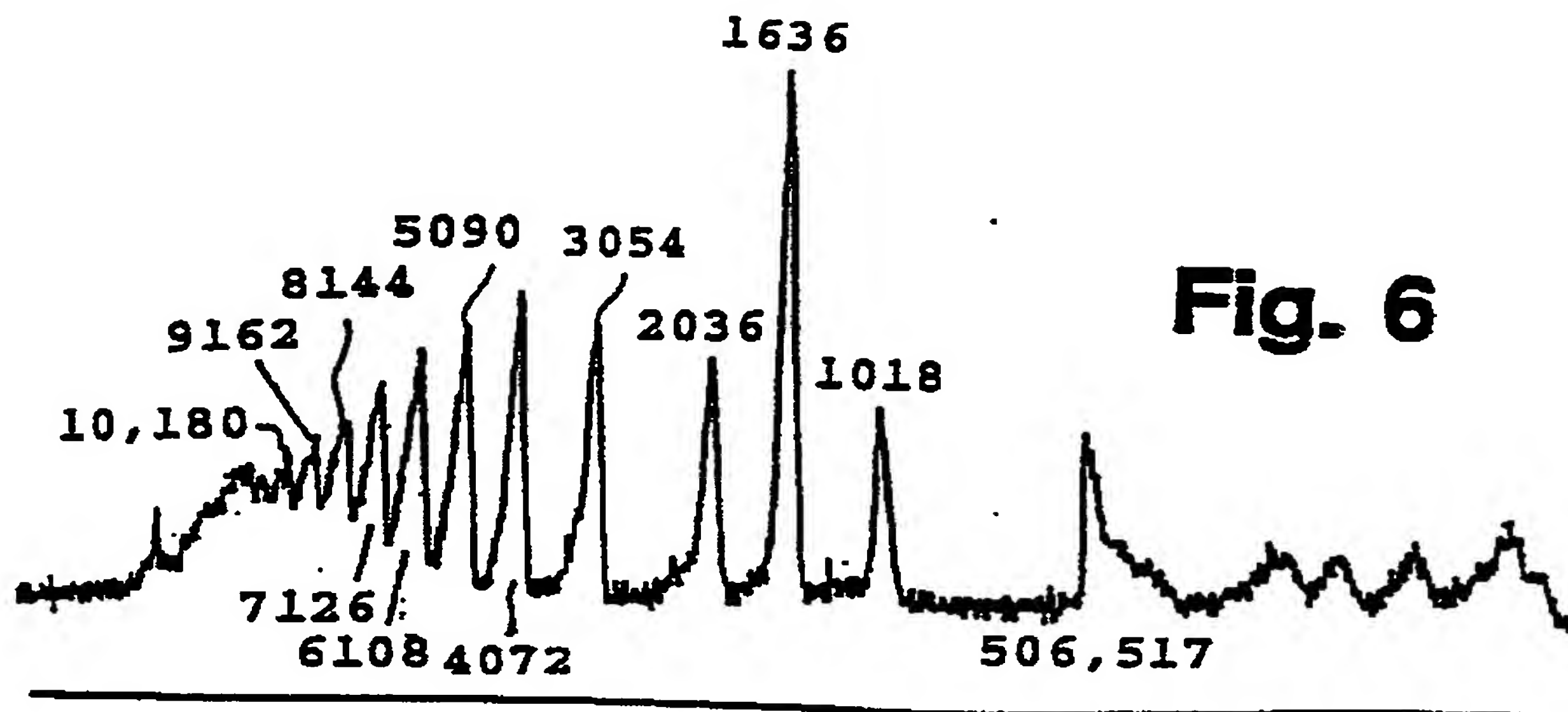
1/10



21 10



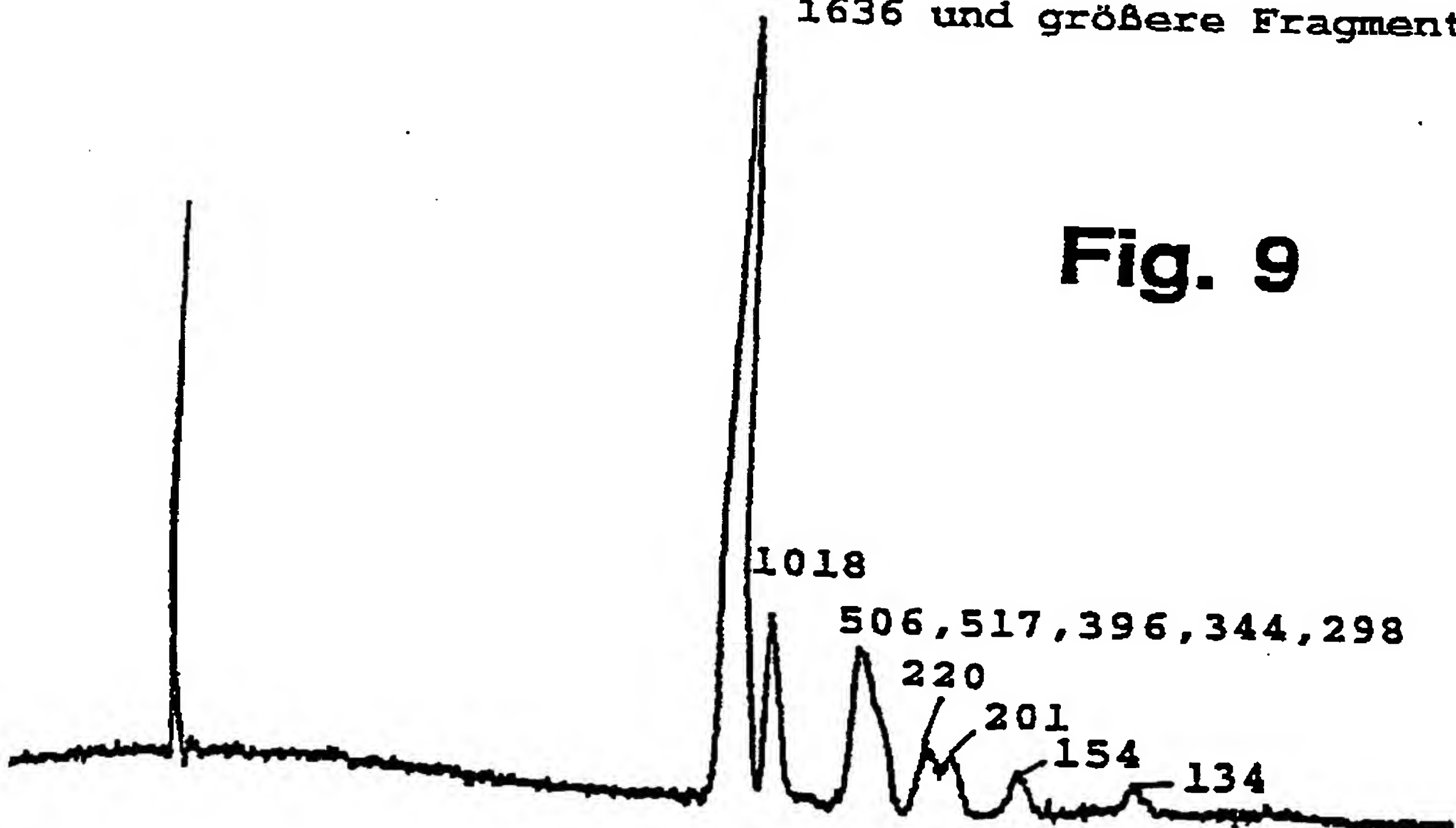
3/10



4/10

Fig. 8

1636 und größere Fragmente

Fig. 9

5:10

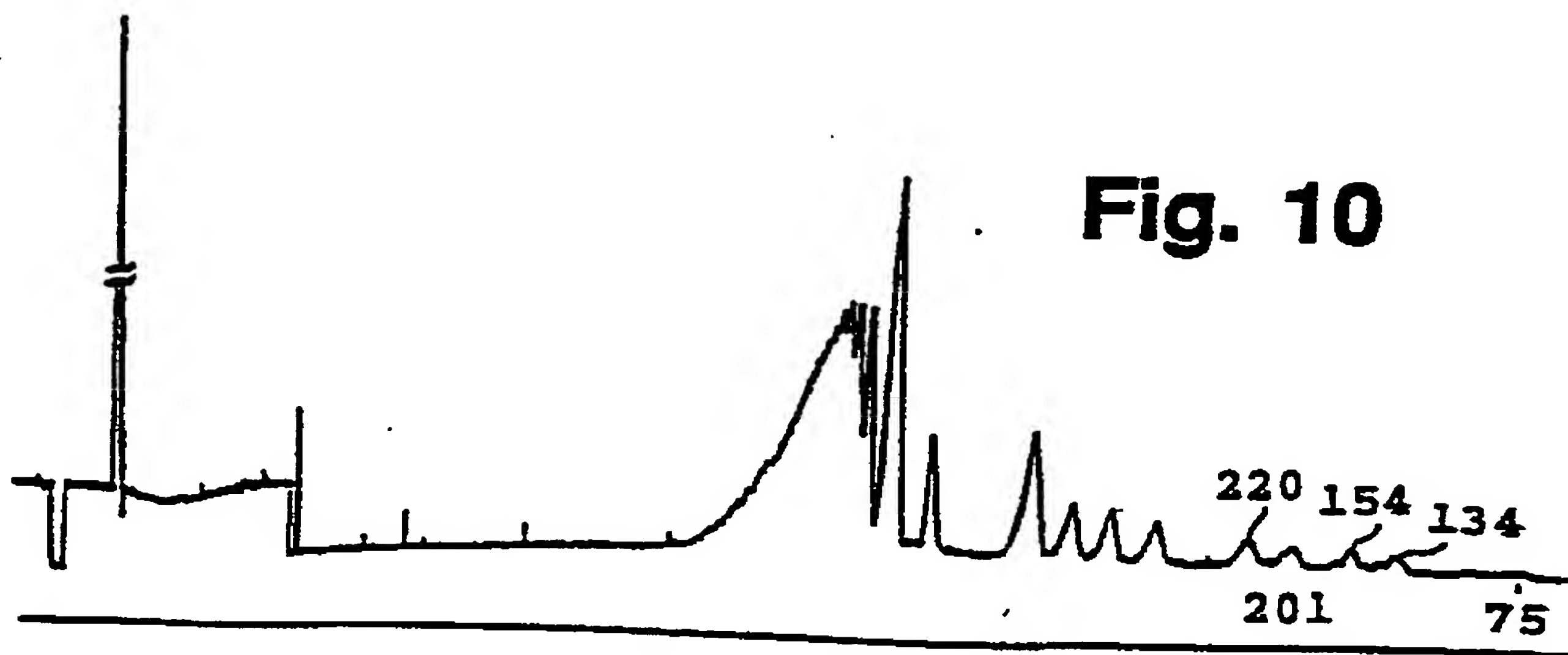


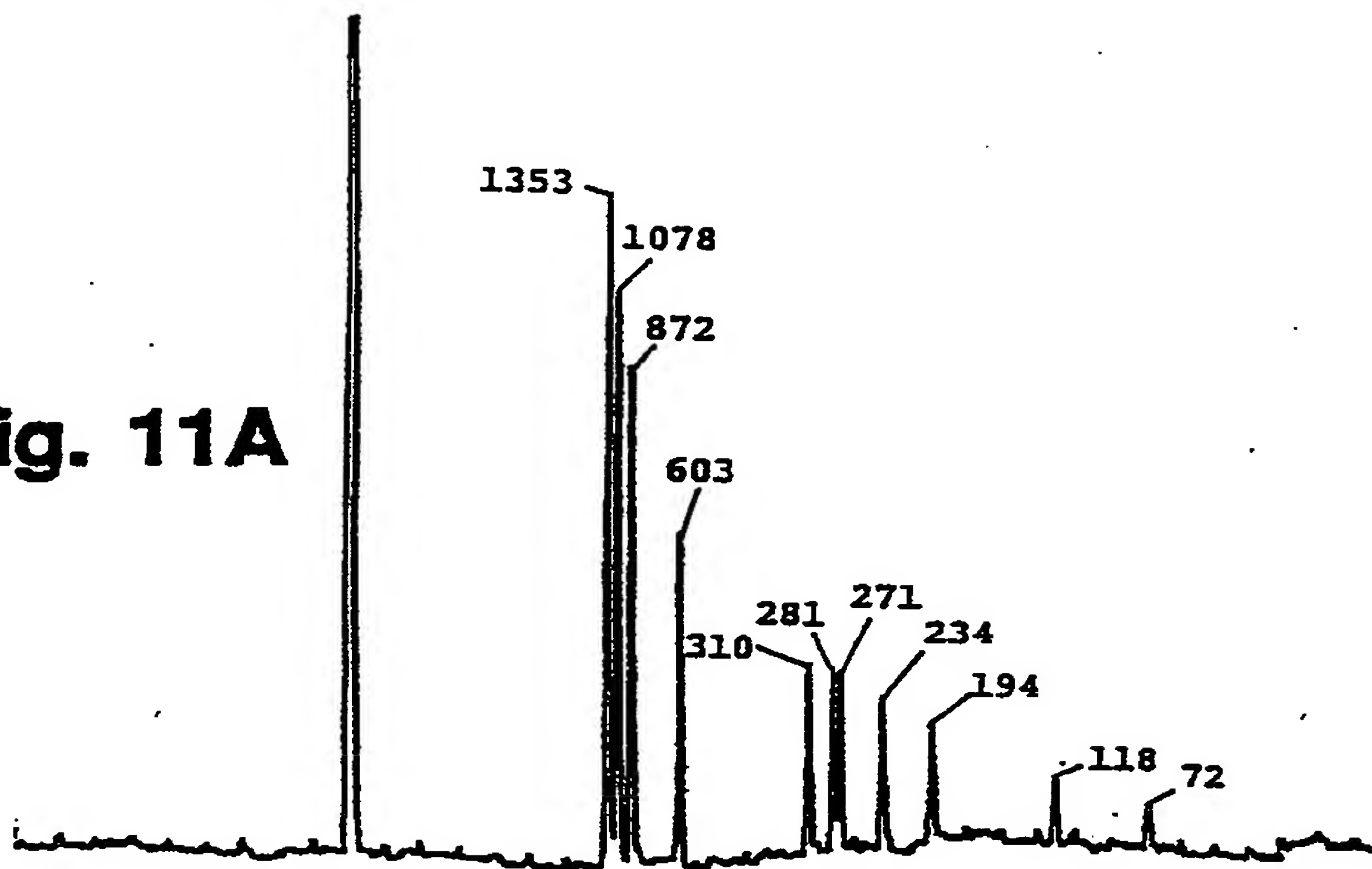
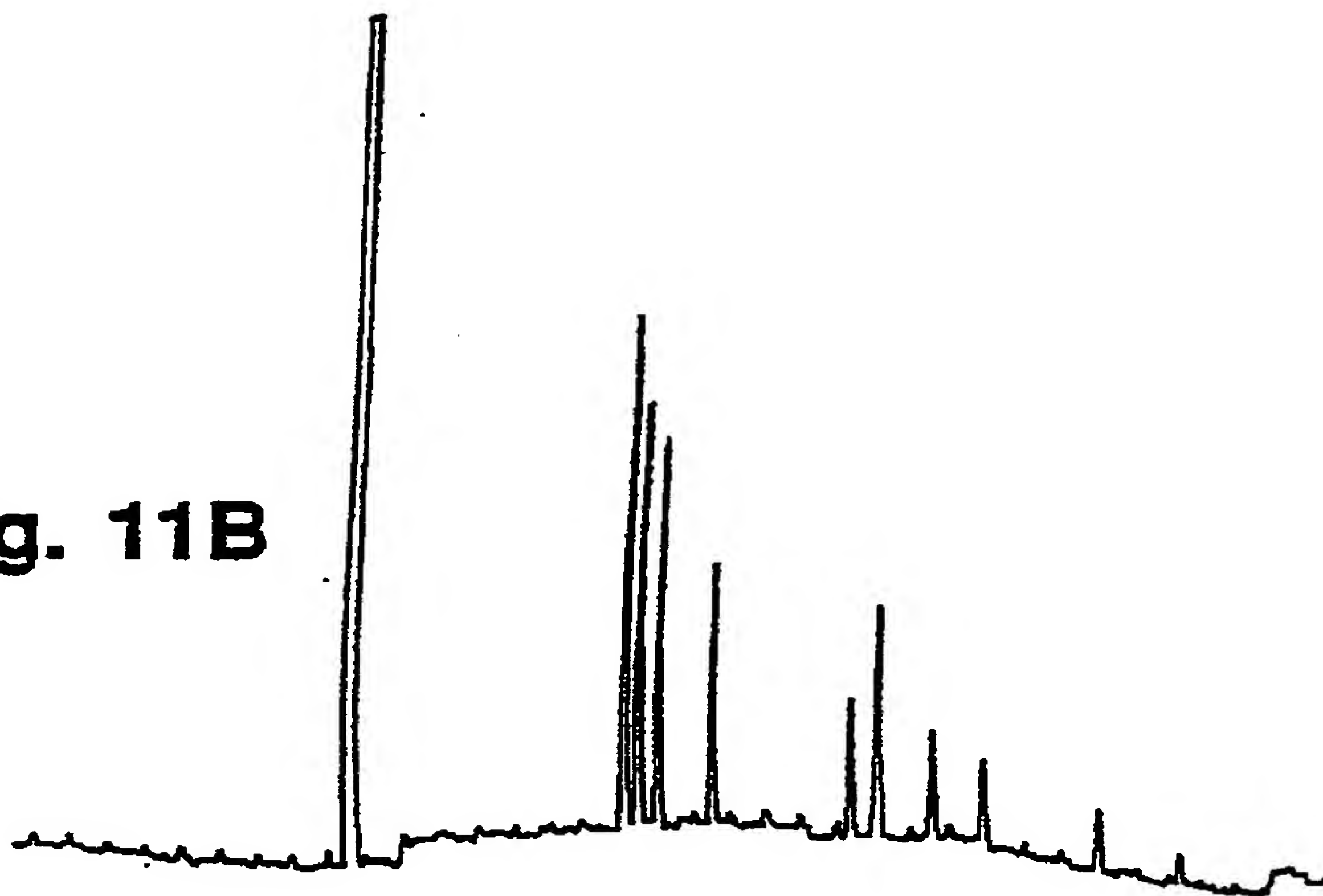
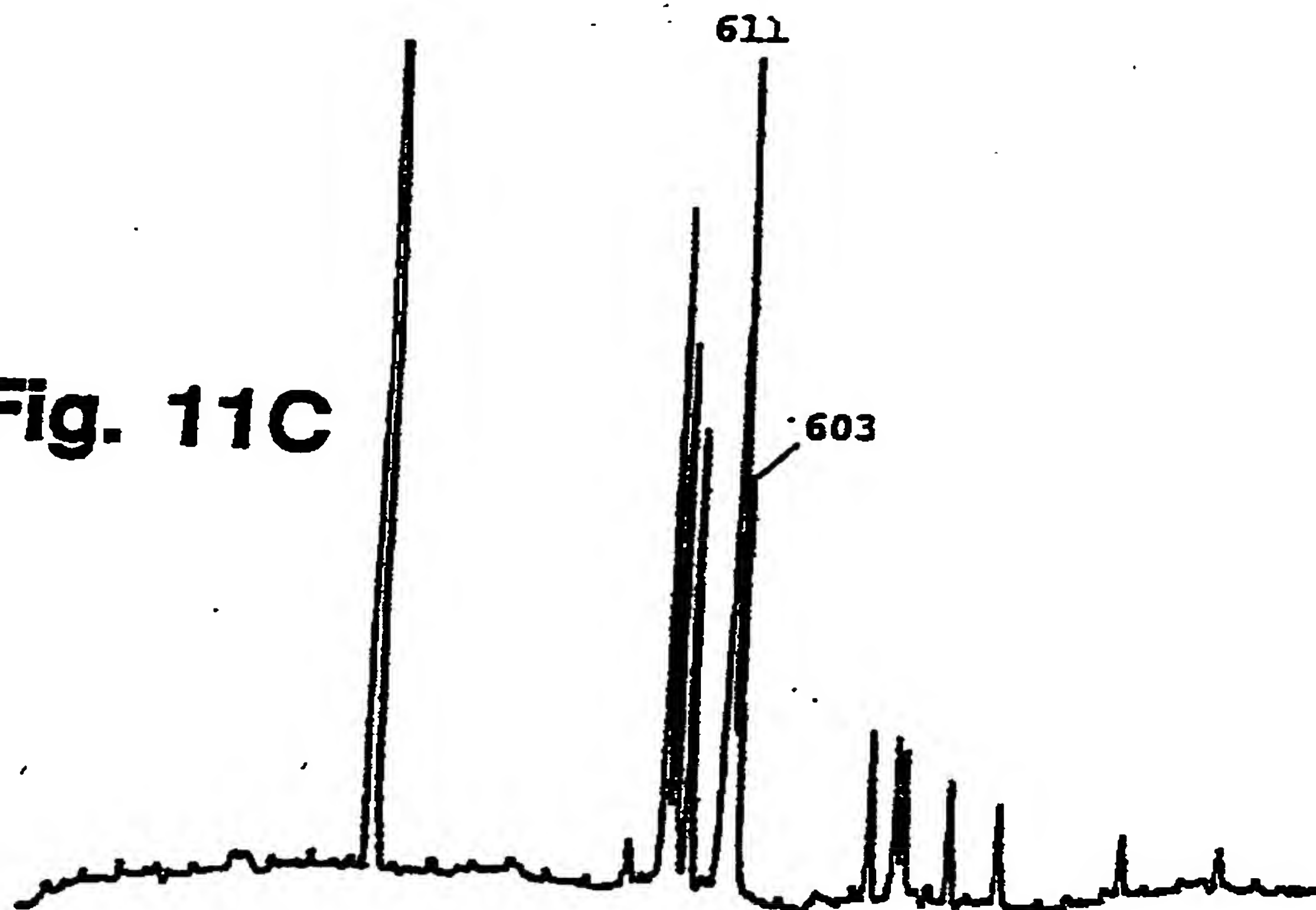
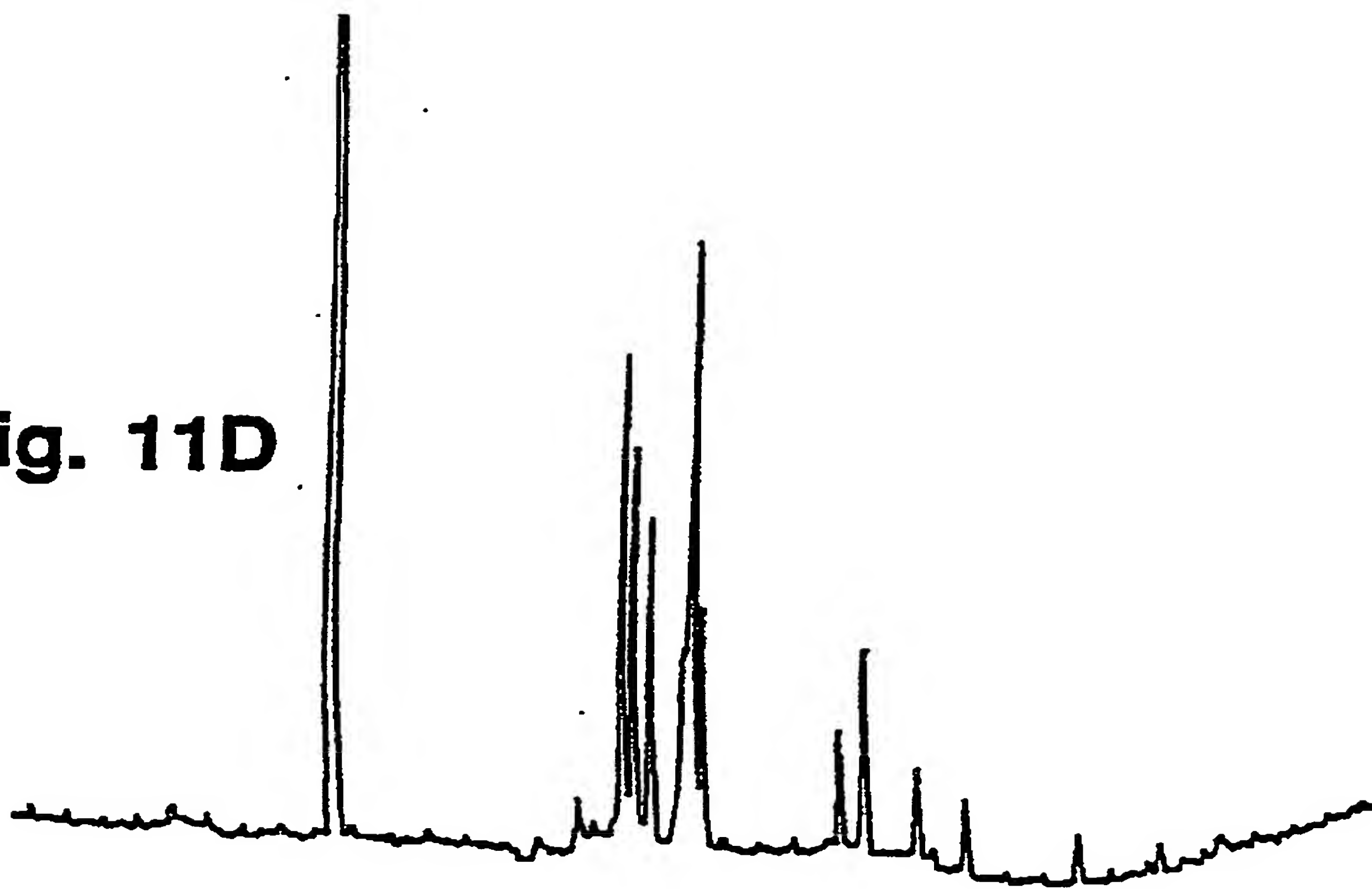
Fig. 11A**Fig. 11B**

Fig. 11C**Fig. 11D**

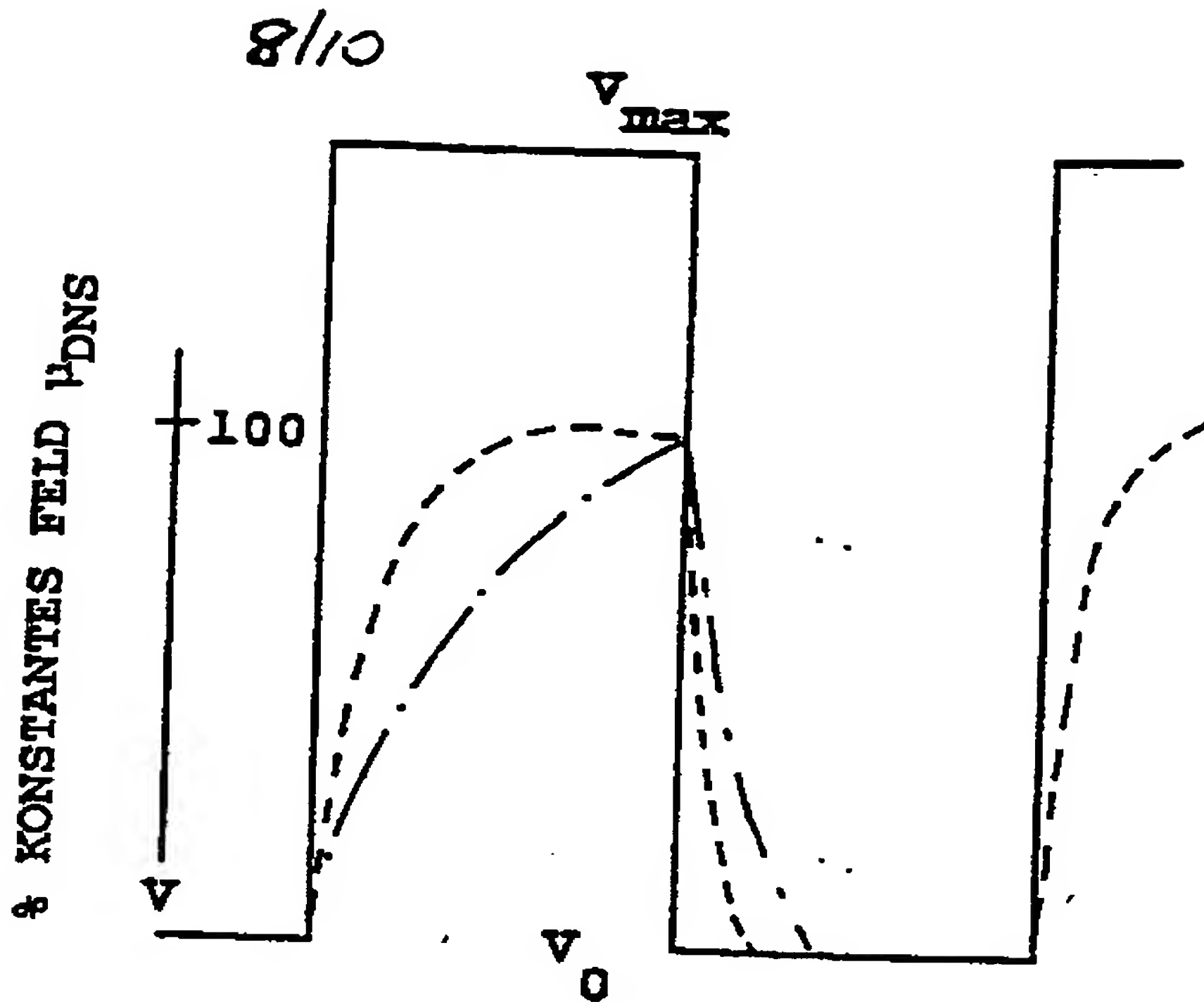


Fig. 12

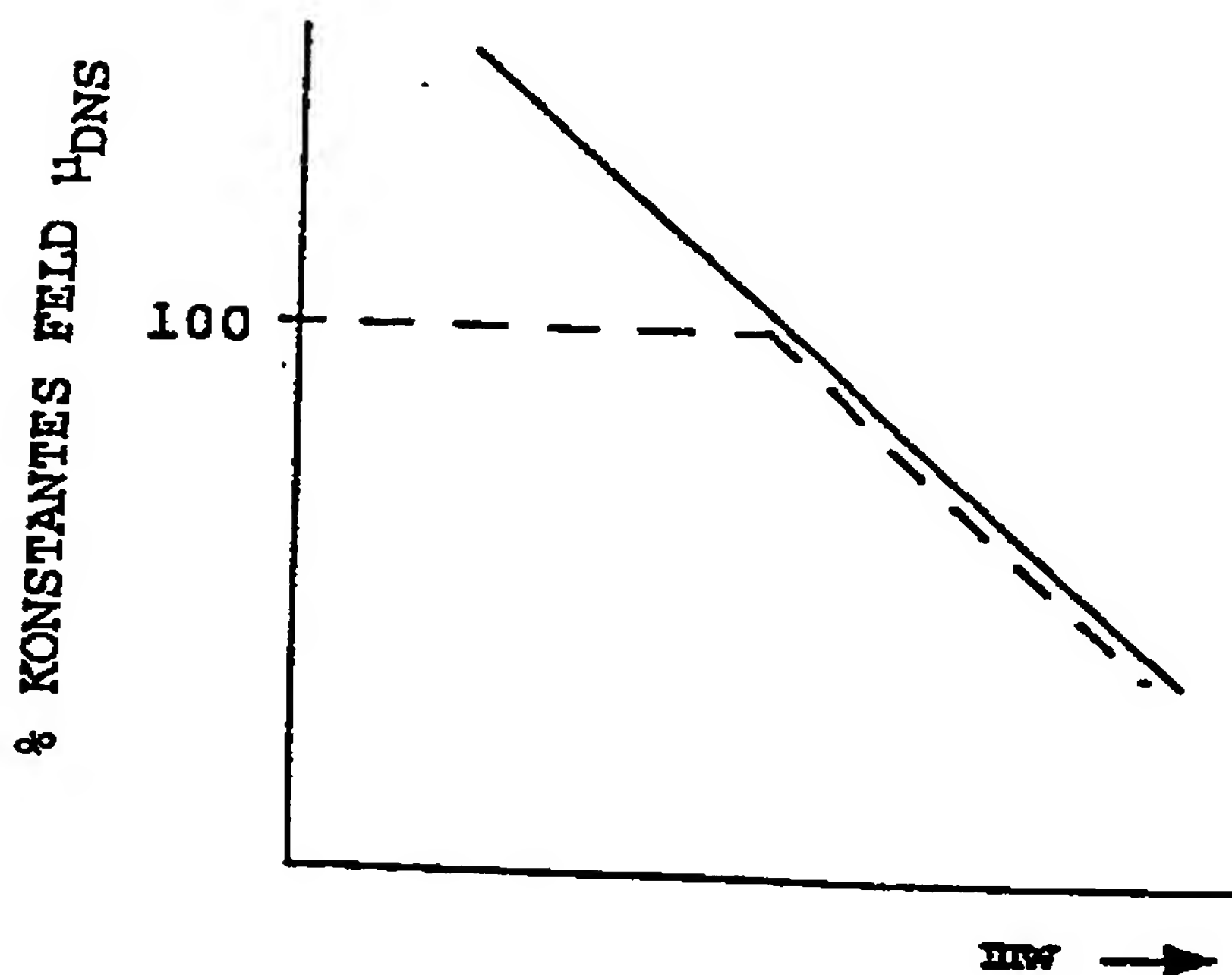
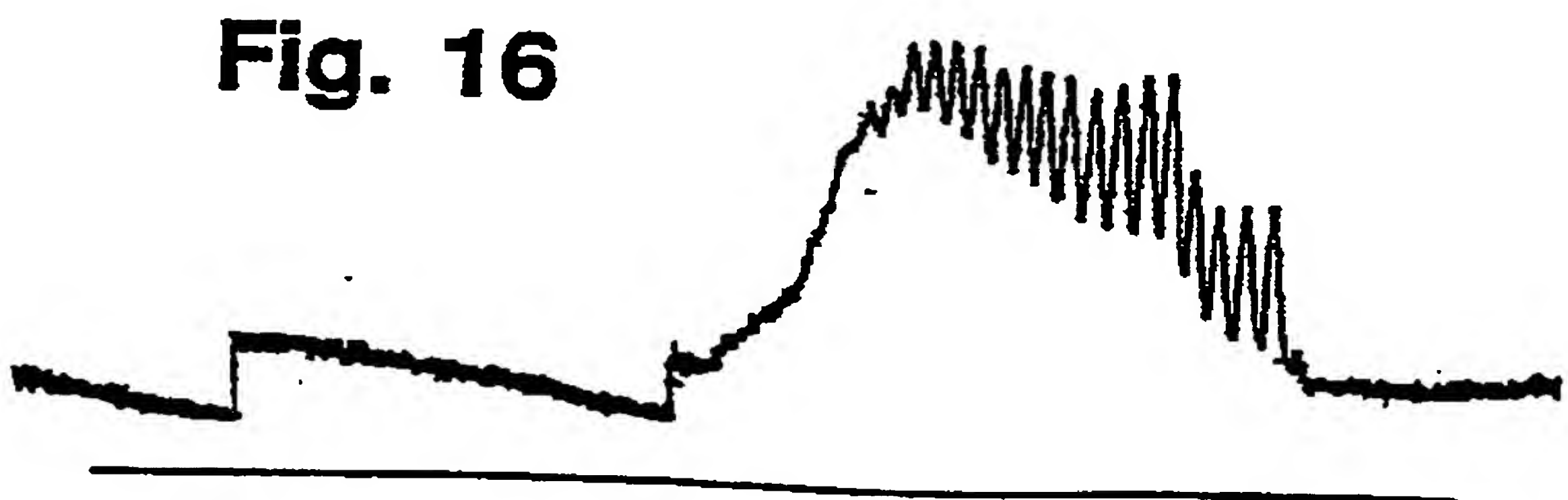
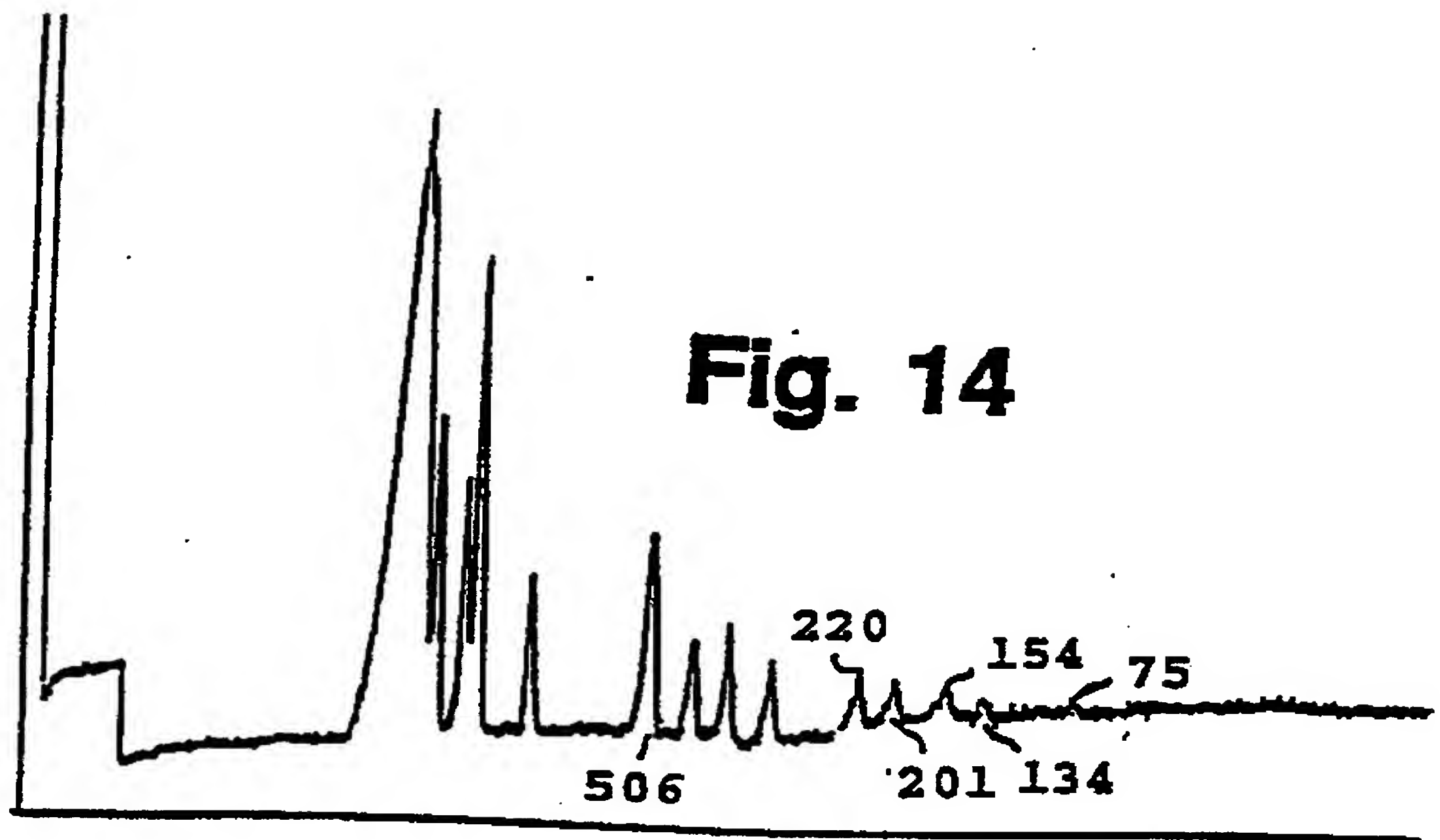
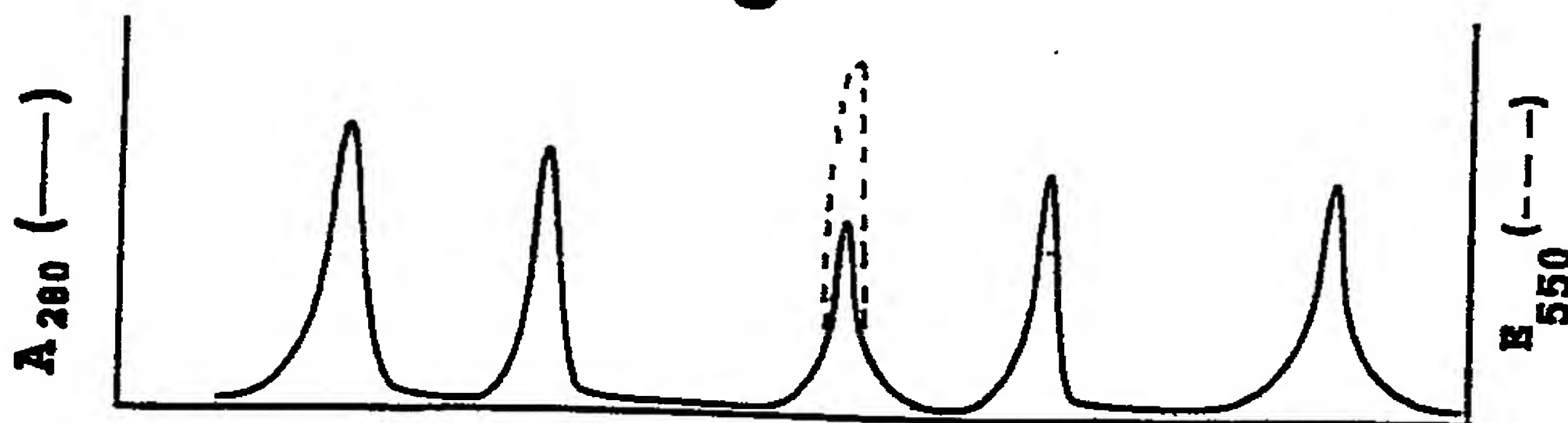


Fig. 13



10/10

Fig. 15

A T A G C C G T A T A A A G C C T A

